

MANUAL DE USO DEL CONFOCAL ZEISS LSM510 INVERTIDO



Ir a la pestaña de “Marcadores” de Adobe Acrobat, en el lateral a la izquierda, para acceder al índice del documento

ENCENDIDO DEL EQUIPO

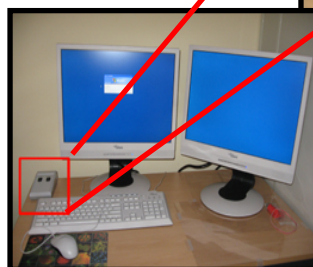
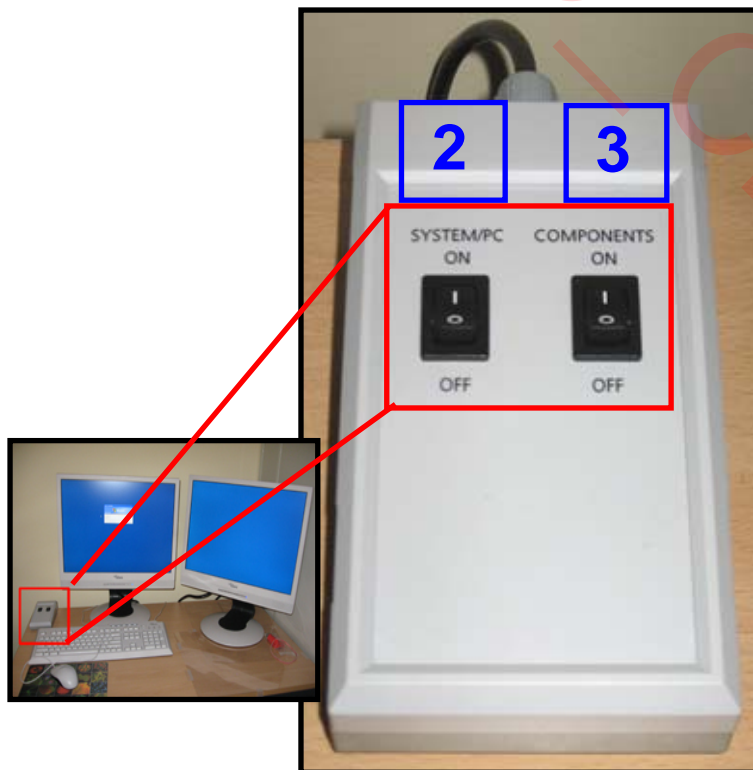
1. Girar a posición **ON** el dispositivo de encendido principal.
2. Pulsar a posición **ON** el botón **System/PC**.
3. Pulsar a posición **ON** el botón **Components**.

1



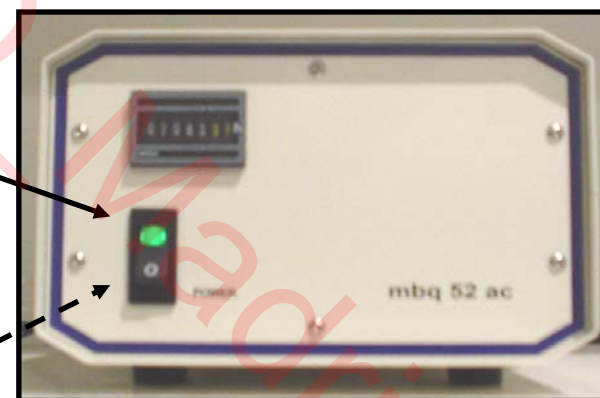
4. Encender si es necesario la lámpara de fluorescencia.

4



LUZ VERDE
ON

OFF



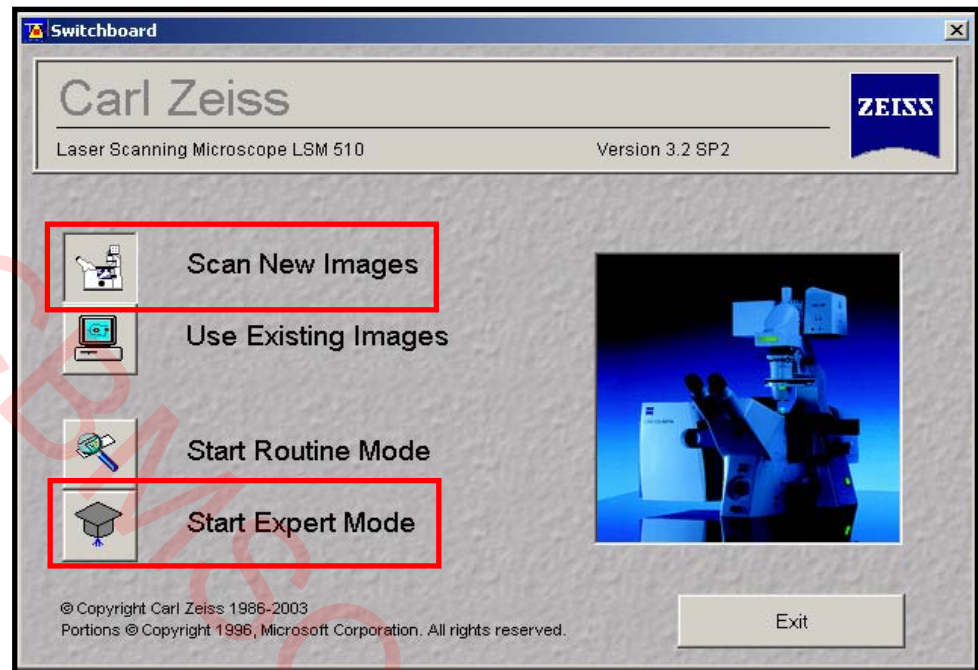
5. Encender el **ordenador**
6. Entrar en la **cuenta de usuario**.
7. Esperar a que Windows se inicie por completo.
8. Hacer doble clic en el icono **LSM510** que aparece en el escritorio.



NOTA IMPORTANTE:

**Si TARDA un RATO en abrirse el programa
ESPERAR. NO hacer doble click de nuevo.**

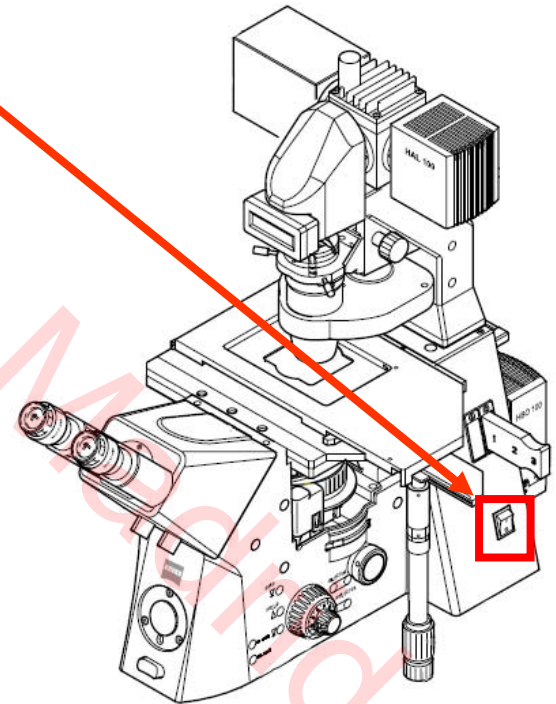
8. En el menú de entrada elegir:
Scan New Images
Start Expert Mode



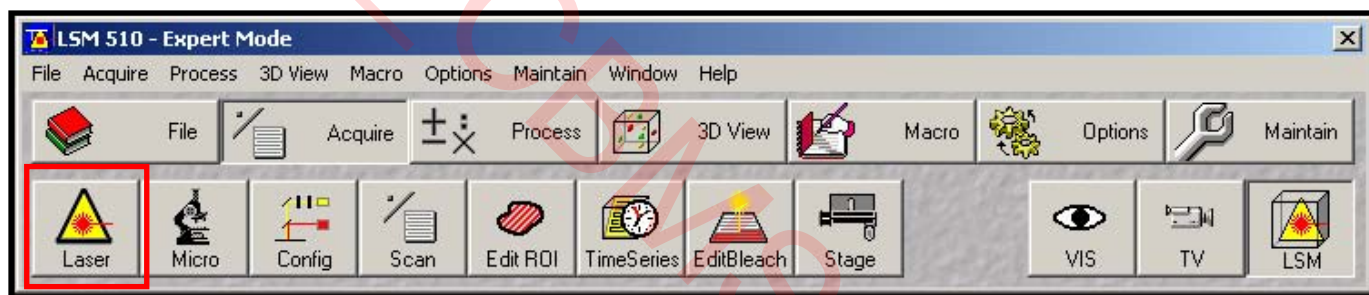
Mientras inicia el sistema no uséis el microscopio para evitar que os de errores de inicio como se explica a continuación.

9. Si durante el inicio del sistema os aparece un **panel de errores** similar a éste proceder de la siguiente manera:

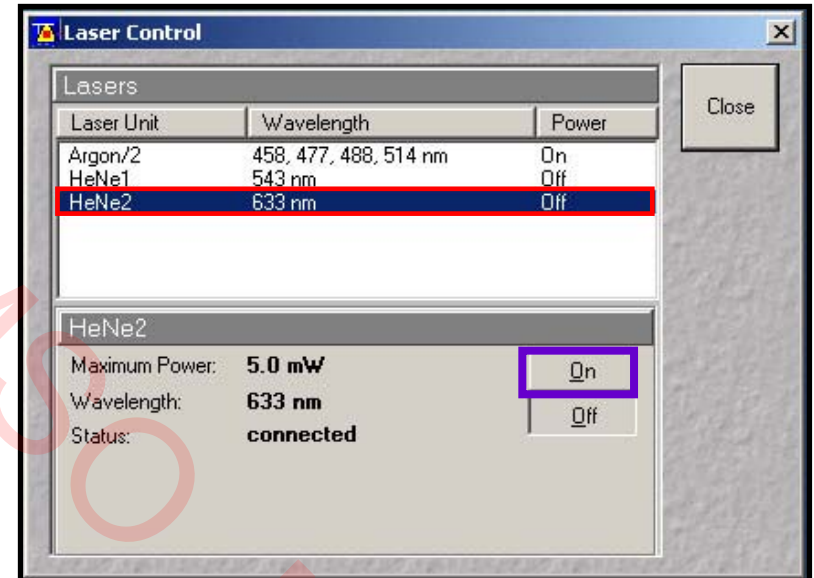
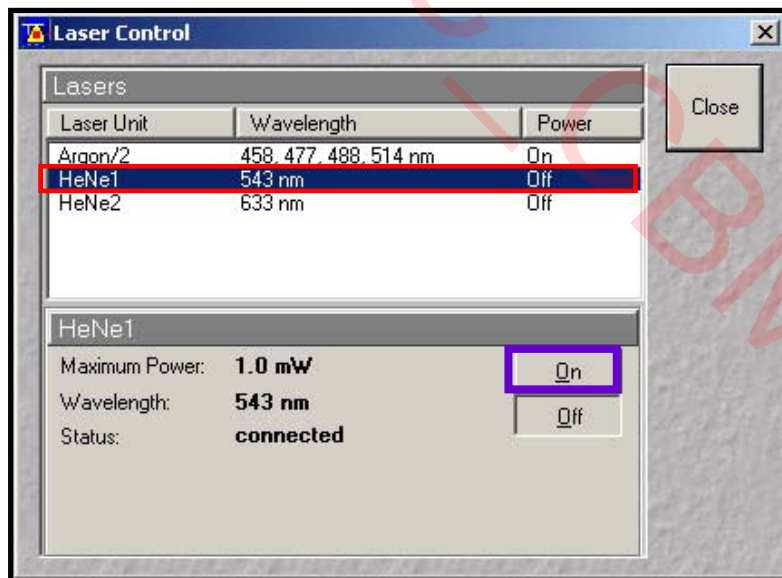
- Cerrar el programa,
- Apagar el microscopio en el **interruptor**,
- Esperar unos segundos y volver a encenderlo,
- Abrir de nuevo el programa **LSM510** del confocal.



10. Hacer clic en el icono **Laser**.



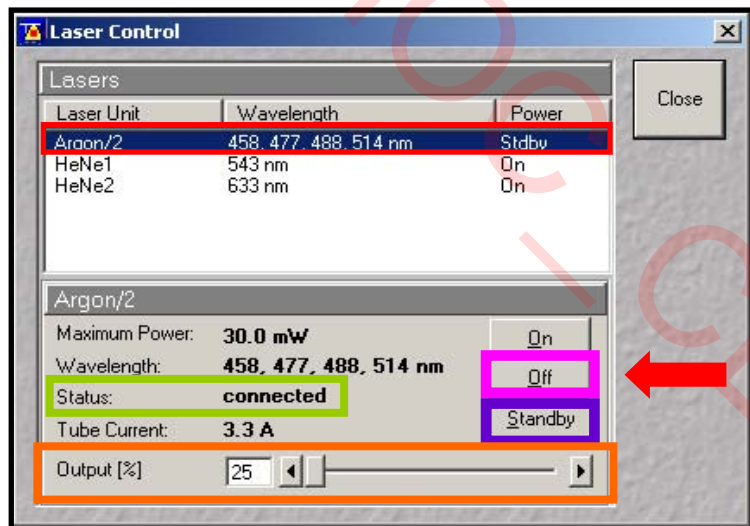
11. Para el encendido de las líneas **HeNe** (Helio Neón), cambiar desde la posición **Off** a **On**.



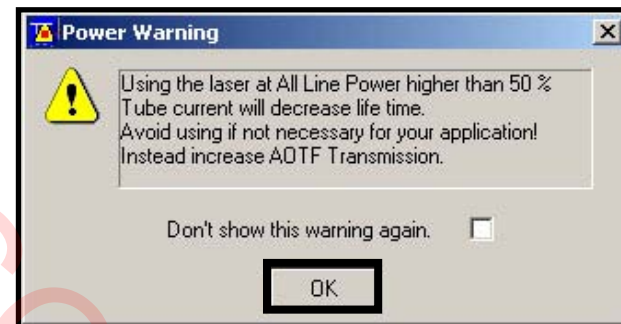
HeNe1 (543): Texas Red, Alexa 555, Alexa 594, Alexa 546, Cy3, Rodamina, Yoduro de Propidio...

HeNe2 (633): Alexa 647, Cy5, To-pro3...

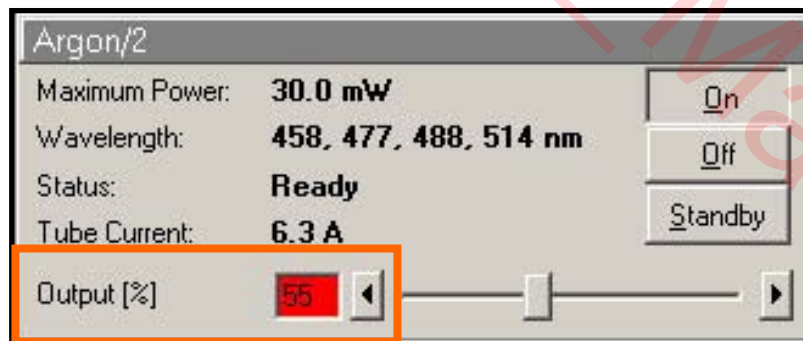
13. Para el encendido del láser de **Argón**, cambiar desde la posición **Off** a **Standby**. Esperar un minuto hasta que en la línea **Status** aparezca **Ready o connected** y entonces cambiar a posición **On**.



13. Subir lentamente el **Output** hasta que aparezca el siguiente mensaje:



14. En el mensaje “**Power Warning**”, hacer clic en **OK**. A continuación, bajar lentamente el **Output** hasta que desaparezca el fondo rojo. Normalmente al **50%**.

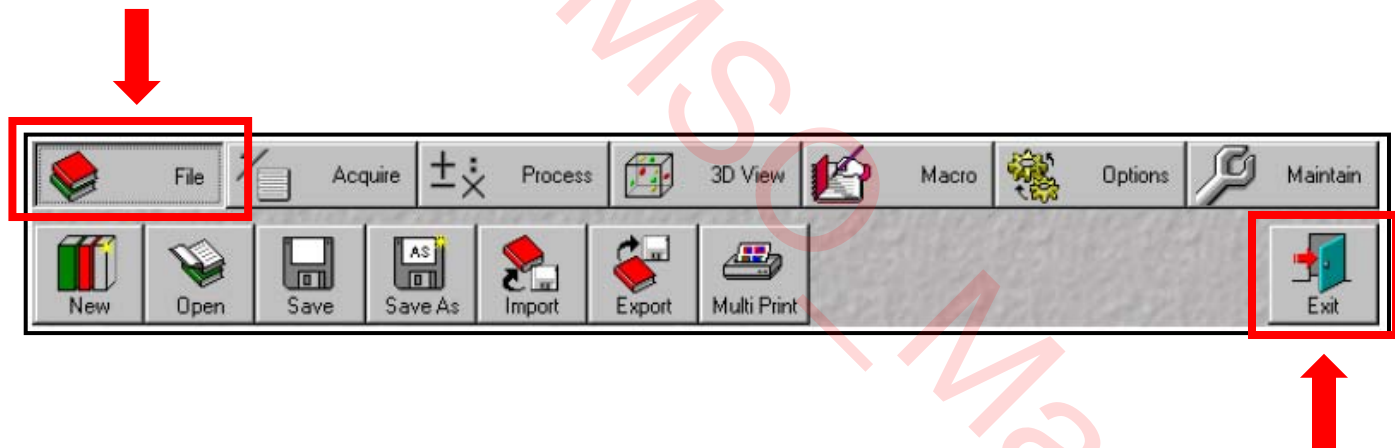


APAGADO DEL EQUIPO

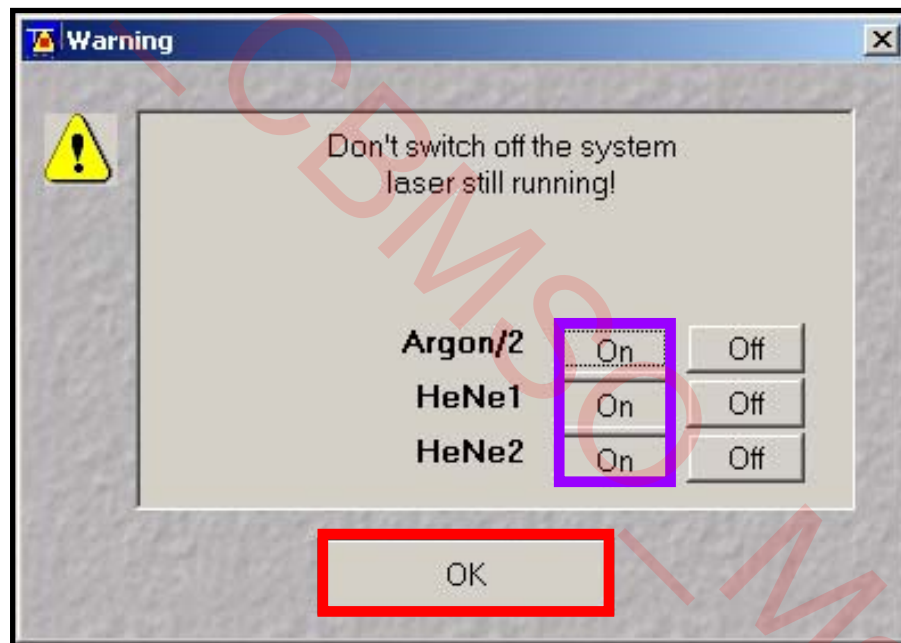
NOTA IMPORTANTE:
Antes de apagar el equipo revisa la página de reservas para comprobar si hay un usuario apuntado a continuación para avisarle.

**SI HAY MÁS USUARIOS A CONTINUACIÓN
Y VAN A TARDAR MENOS DE 90' EN LLEGAR**

1. Quitar la muestra, bajar los objetivos y limpiarlos si se ha utilizado aceite de inmersión
2. Poner la funda al microscopio
3. Salir del programa haciendo clic en **File** y luego en **Exit**.

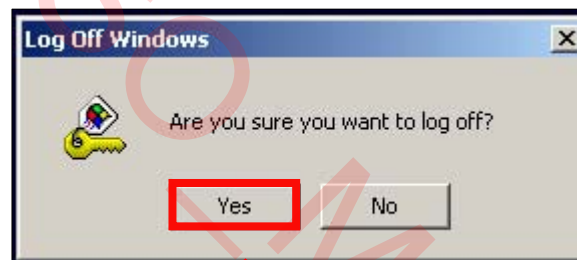


4. En la ventana emergente **Warning**, dejar los láseres que estén encendidos en posición **On** y seleccionar **OK**.



5. Transferir las imágenes a un **CD/DVD**, **pendrive** o al servidor **La Cripta**.

6. Salir de la cuenta de usuario del ordenador en **Start/ Log Off**

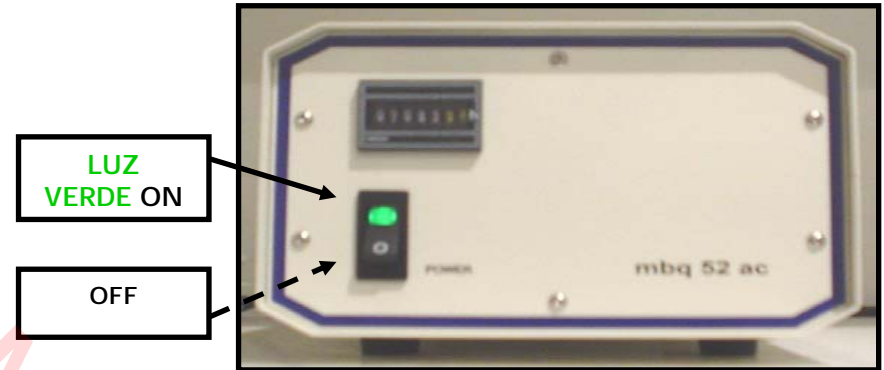


**SI HAY MÁS USUARIOS A CONTINUACIÓN
Y VAN A TARDAR MÁS DE 90' EN LLEGAR**

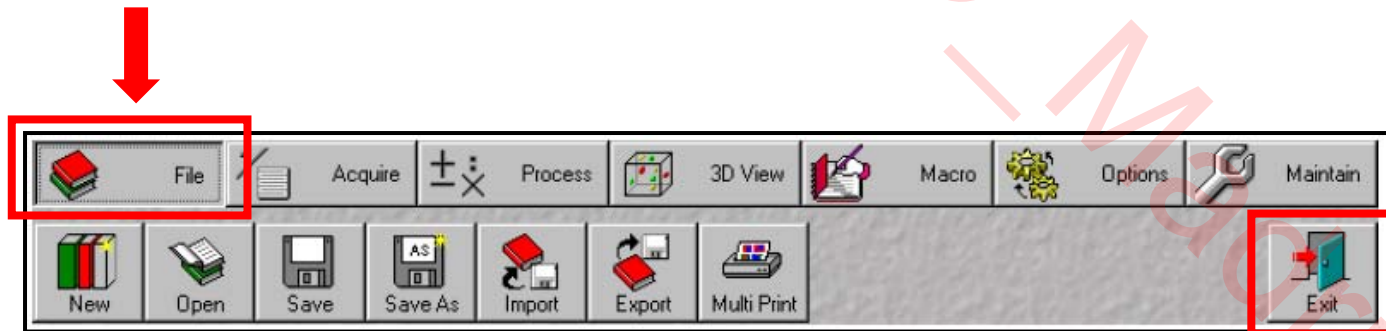
1. Quitar la muestra, bajar los objetivos y limpiarlos si se ha utilizado aceite de inmersión

2. Poner la funda al microscopio

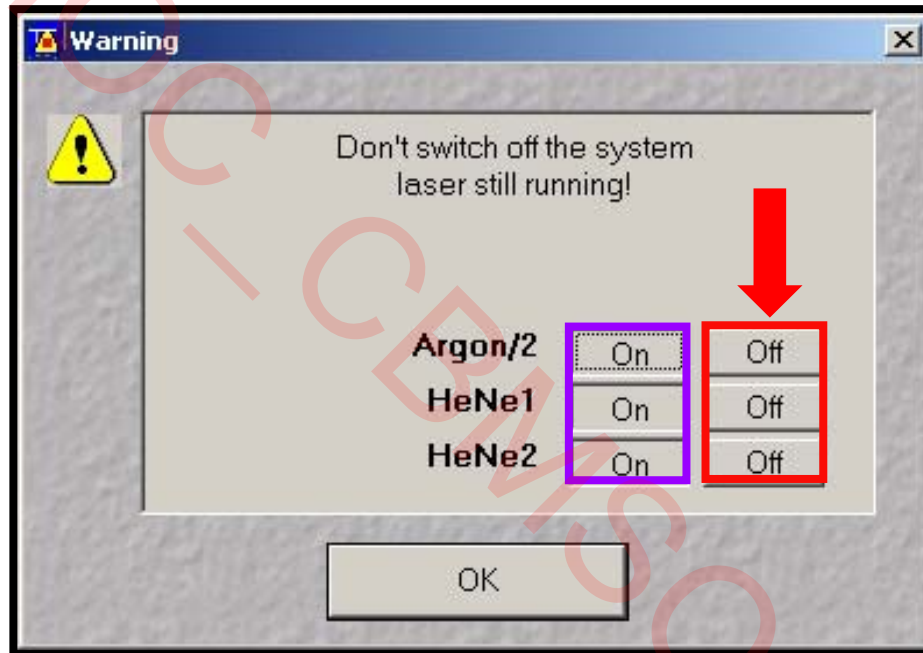
3. Apagar lámpara de fluorescencia si estaba encendida.



4. Salir del programa haciendo clic en **File** y luego en **Exit**.

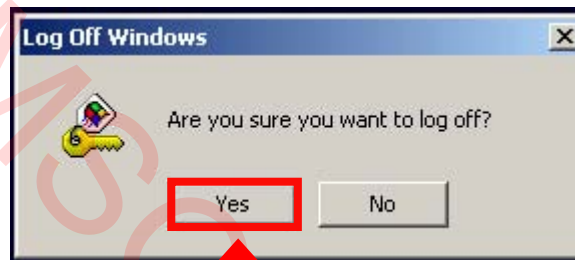


5. En la pantalla emergente **Warning**, cambiar los láseres de posición **On** a posición **Off** para apagarlos y pulsar **OK**.



6. Transferir las imágenes a un **CD/DVD**, **pendrive** o al servidor **La Cripta**.

7. Salir de la cuenta de usuario en el ordenador en **Start/ Log Off**.

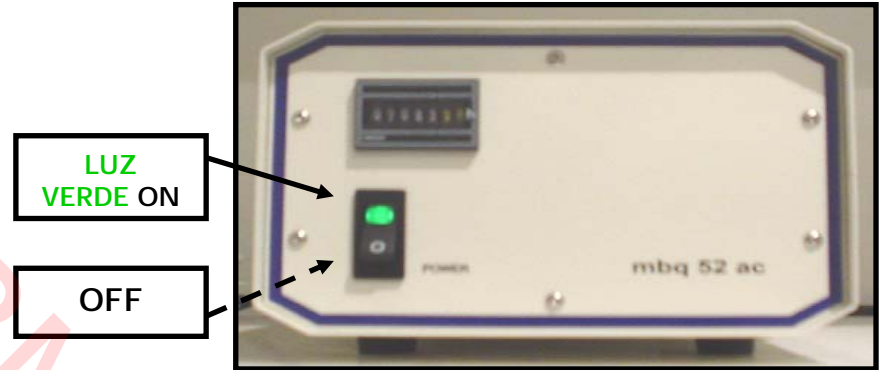


NO HAY NADIE DETRÁS. ERES EL ÚLTIMO.

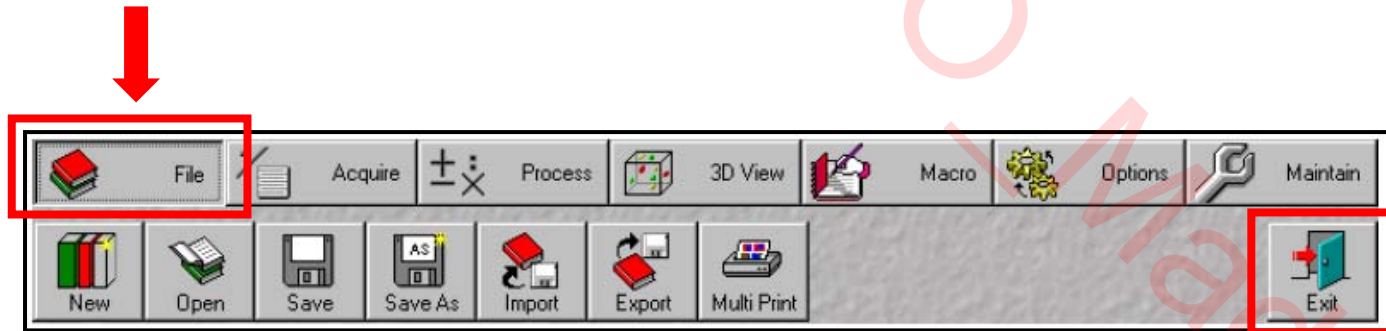
1. Quitar la muestra y limpiar los objetivos si se ha utilizado aceite de inmersión.

2. Poner la funda al microscopio

3. Apagar lámpara de fluorescencia si estaba encendida.

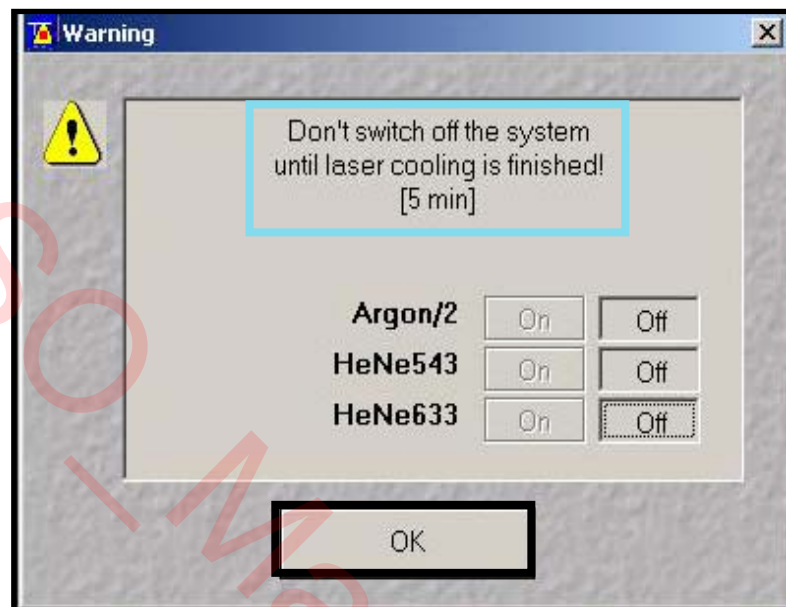
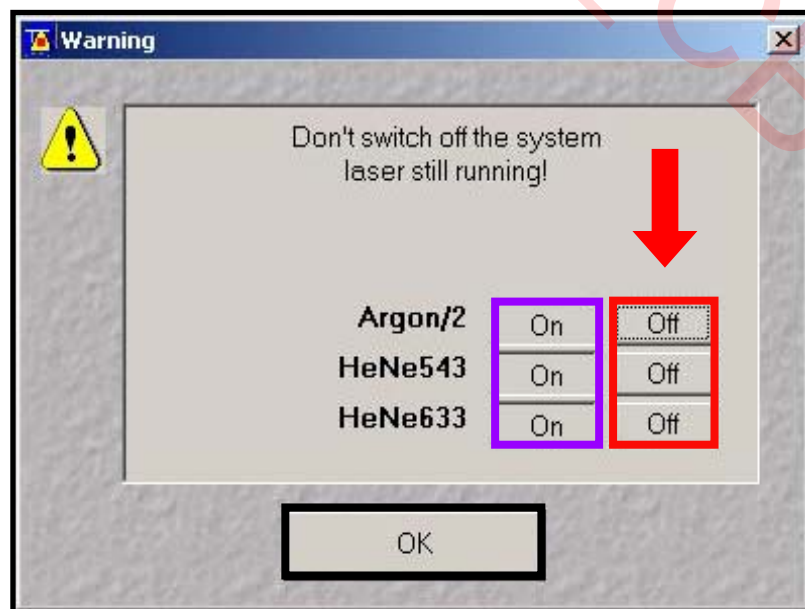


4. Salir del programa haciendo clic en **File** y luego en **Exit**.



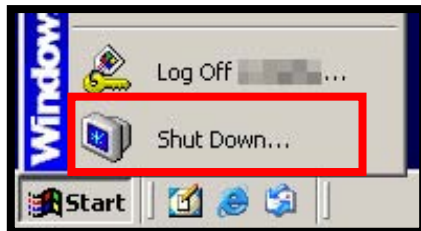
5. En la pantalla emergente **Warning**, cambiar los láseres de posición **On** a posición **Off** para desactivarlos y pulsar **OK**.

IMPORTANTE: Cuando se desactiva el primero de ellos, aparece en la misma pantalla emergente una leyenda en la que se nos avisa de que **NO** debemos de apagar el sistema hasta que el enfriamiento del láser Argón/2 haya terminado (aproximadamente tarda unos 5 minutos)



6. Transferir las imágenes a un **CD/DVD**, **pendrive** o al servidor **La Cripta**.

7. Apagar el ordenador en **Start/ Shut down**.



8. Poner en posición **OFF** los botones **System/PC** y **Components**, pero **NUNCA antes de que deje de funcionar el ventilador del láser de Argón/2** (aproximadamente 5 minutos después de haber apagado los láseres. **Se deja de oír el ventilador más fuerte**)



9. Girar a posición **OFF** el dispositivo de encendido principal.



EL MICROSCOPIO

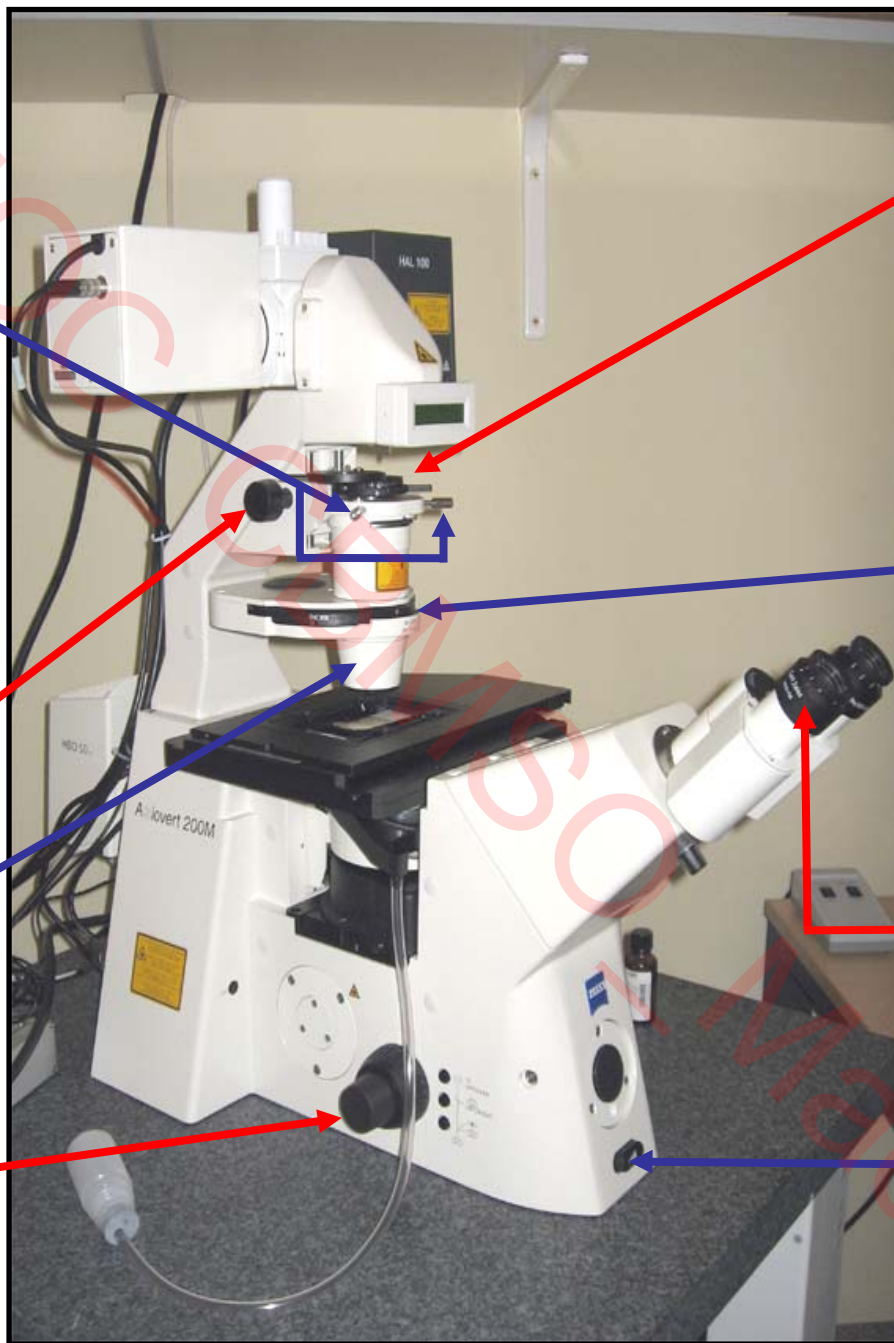
Tornillos para el centrado en el ajuste de Köhler



Para subir y bajar el condensador en el ajuste de Köhler

Condensador

Para enfocar



Filtro azul y polarizador de Nomarski



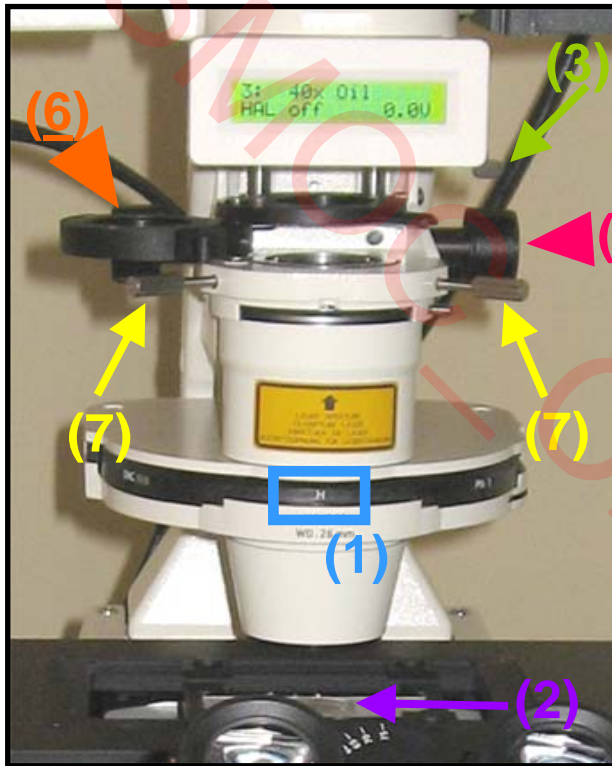
Posiciones del condensador para técnicas de luz transmitida



Oculares

Regulador de potencia de luz transmitida

AJUSTE DE KHÖLER



- Enfocar la preparación (2)
- Seleccionar Campo claro (H) en el condensador (1)
- Retirar el polarizador de Nomarski (6)
- Cerrar al máximo el campo iluminado con la palanca (3). **Imagen 1**
- Subir o bajar el condensador (4) hasta observar algo parecido a la **Imagen 2**
- Con la ayuda de los tornillos (7) centrar la imagen hasta que quede como la **Imagen 3**
- Volver a abrir el campo iluminado con la palanca (3).

Imagen 1

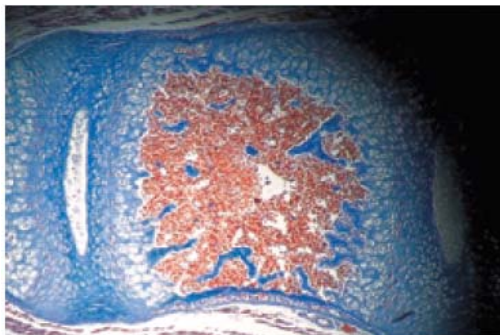


Imagen 2

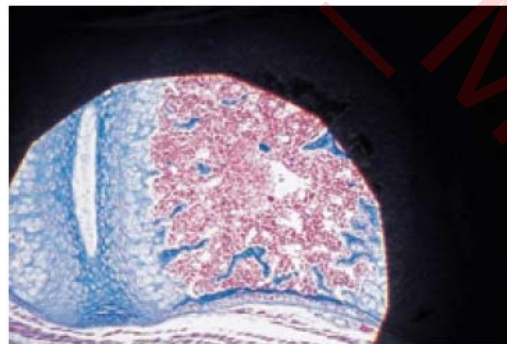
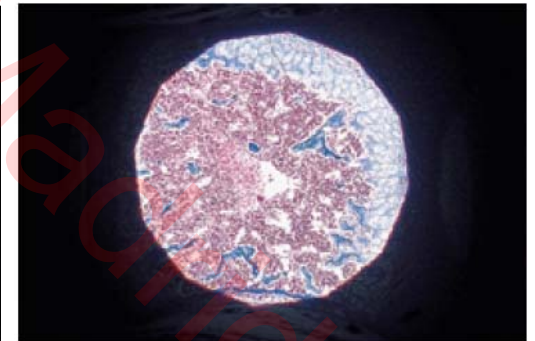


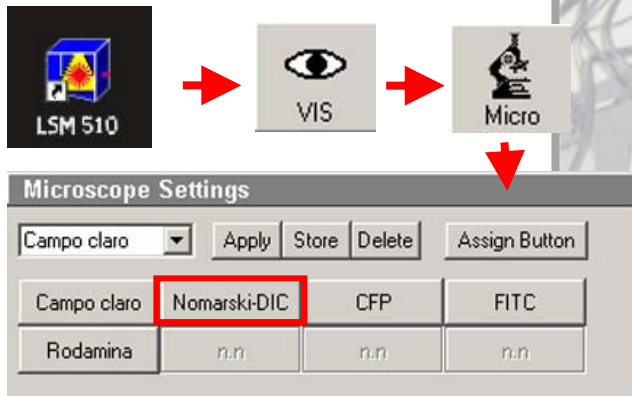
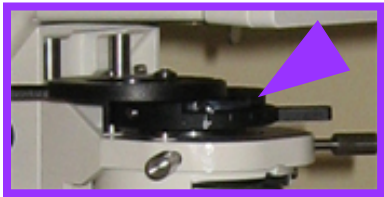
Imagen 3



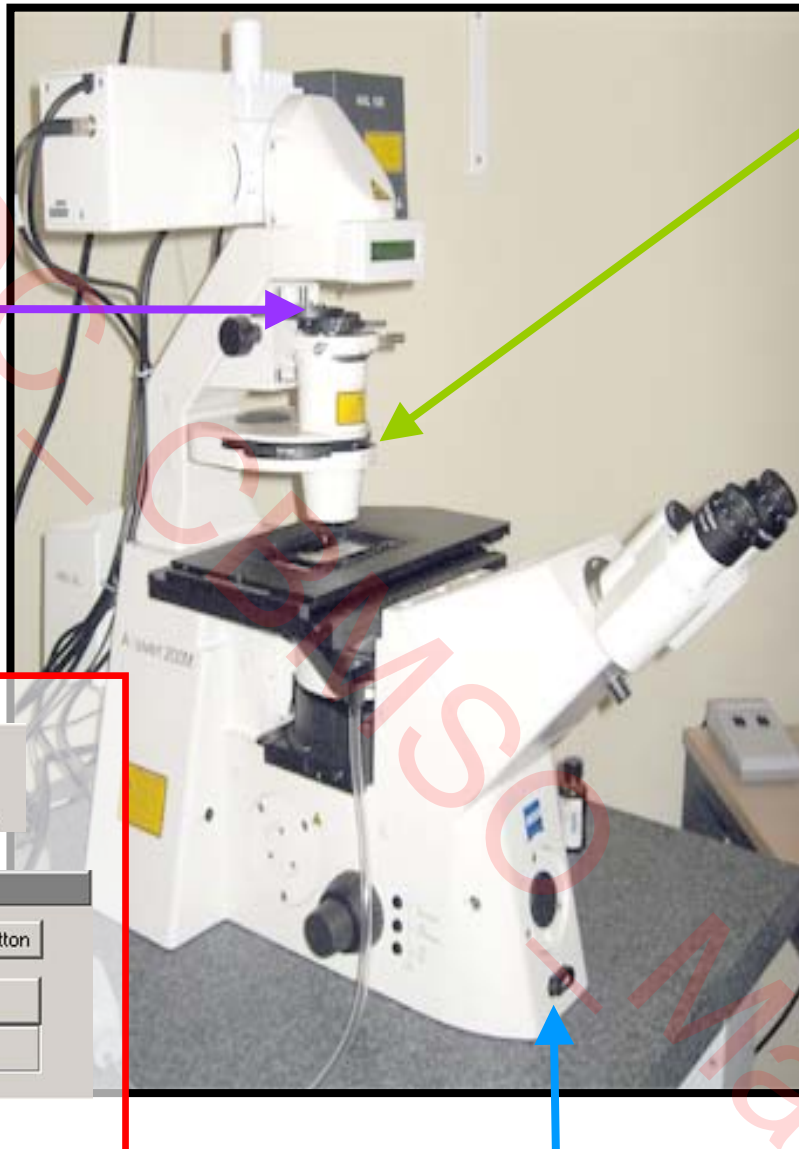
NOTA: Cada vez que cambiéis de objetivo deberíais realizar el ajuste de nuevo.

PARA VER NOMARSKI (DIC)

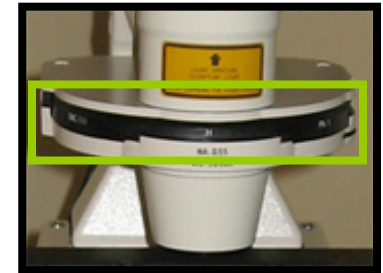
Colocar el polarizador
(filtro inferior)



Desde el programa del confocal,
colocar el filtro “**Nomarski-DIC**”



Condensador en
posición DIC II (25x) y
DIC III (40x, 63x y 100x)



25 x



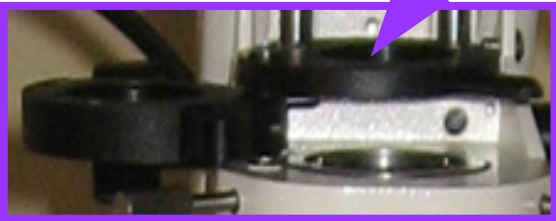
40x, 63x y
100x

Regular la potencia
de luz

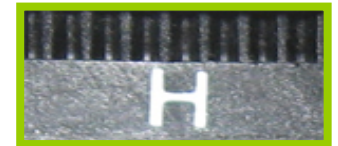
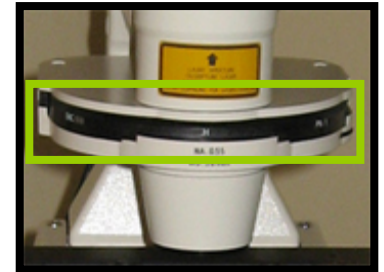
AVISO: si vais a tomar
imágenes con esta técnica
avisadnos antes para que
os pongamos los prismas
de Wollaston.

PARA VER CAMPO CLARO (H)

Colocar el filtro azul (filtro superior)

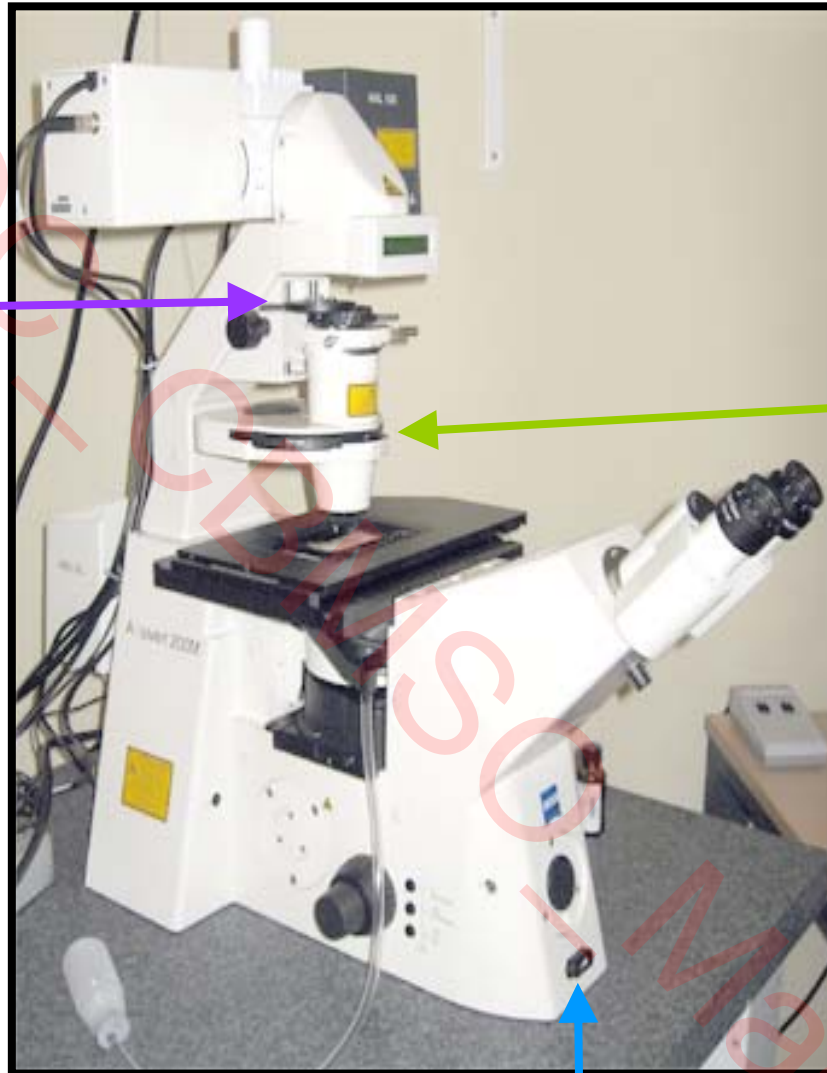


Condensador en posición H (todos los objetivos)



Para todos los objetivos

Regular la potencia de luz



USO DEL PROGRAMA DEL CONFOCAL

ADQUISICIÓN DE IMÁGENES



**PARA MIRAR AL MICROSCOPIO
(ACQUIRE-MICRO)**

Seleccionar el icono **"Micro"** del menu **"Acquire"** para abrir el panel de control del microscopio

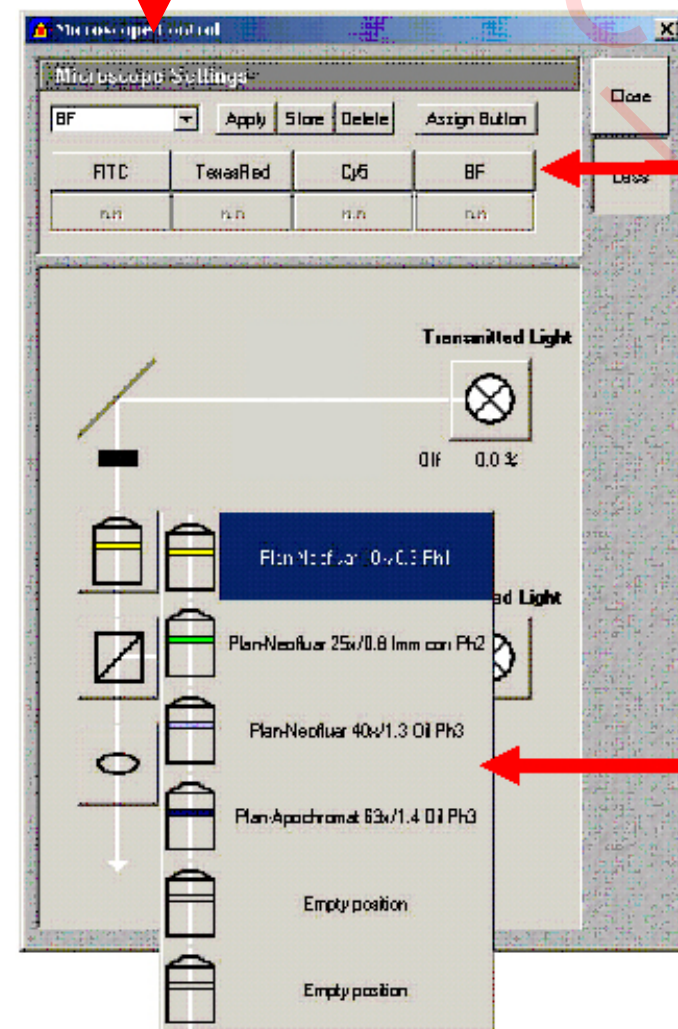
VIS = ver al microscopio

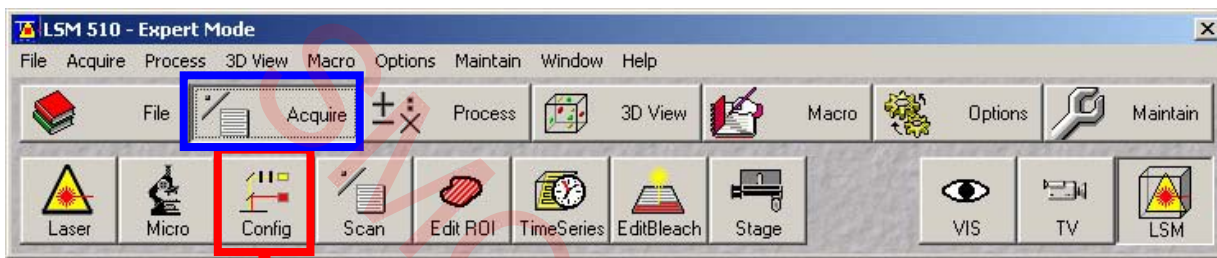
LSM = adquirir en confocal

Cambio de filtros de
Fluorescencia, campo claro o Nomarski (DIC)

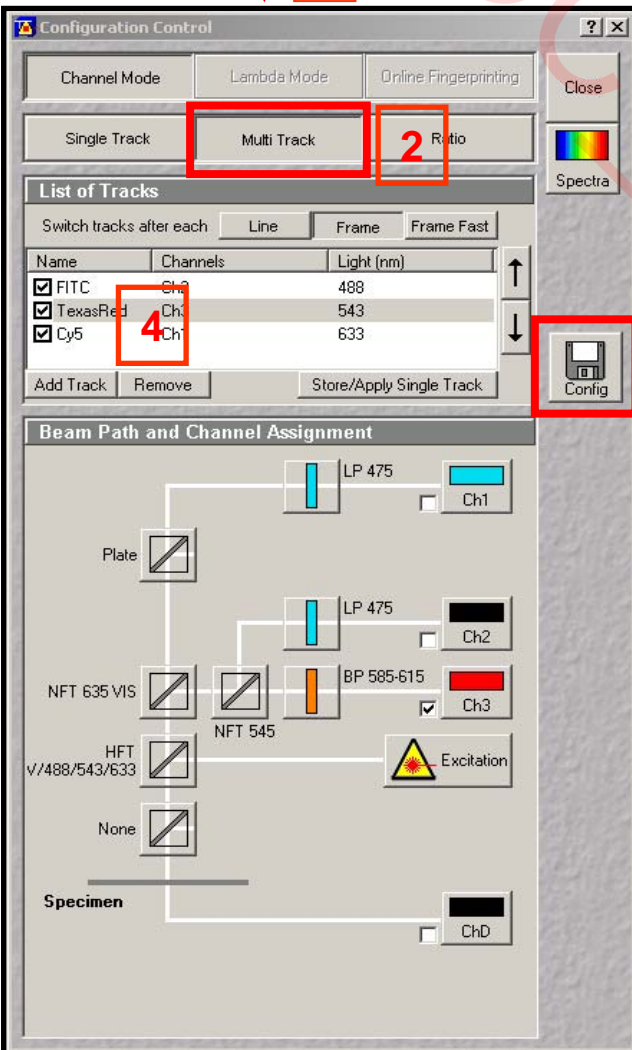
Cambio de objetivos.

Hacerlo siempre de **uno en uno** y después de haber **bajado** ligeramente la **posición**.
De esta manera no romperéis nunca la preparación.





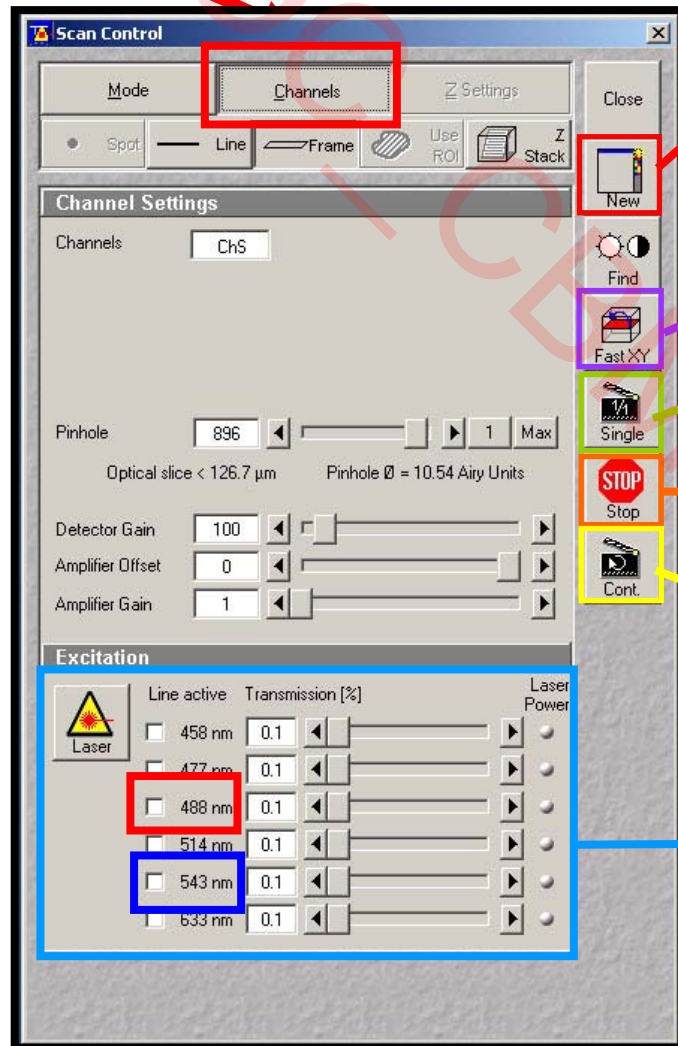
SELECCIÓN DE CANALES (ACQUIRE-CONFIG)



- Abrir el panel de configuración con el icono **"Config"** (1) del menu **"Acquire"**
- Seleccionar la opción **"Multi Track"** (2)
- Abrir la lista de métodos en el icono **"Config"** (3)
- Seleccionar el método requerido y seleccionar **"Apply"**
- Para ver uno u otro canal por separado activar o desactivar las pistas (4)



PARÁMETROS DE ESCANEO (SCAN-CHANNELS)



Abrir nuevo panel de imagen

Escaneo continuo a máxima
velocidad y resolución de
512x512.
Esta opción se utiliza para
optimizar las condiciones.

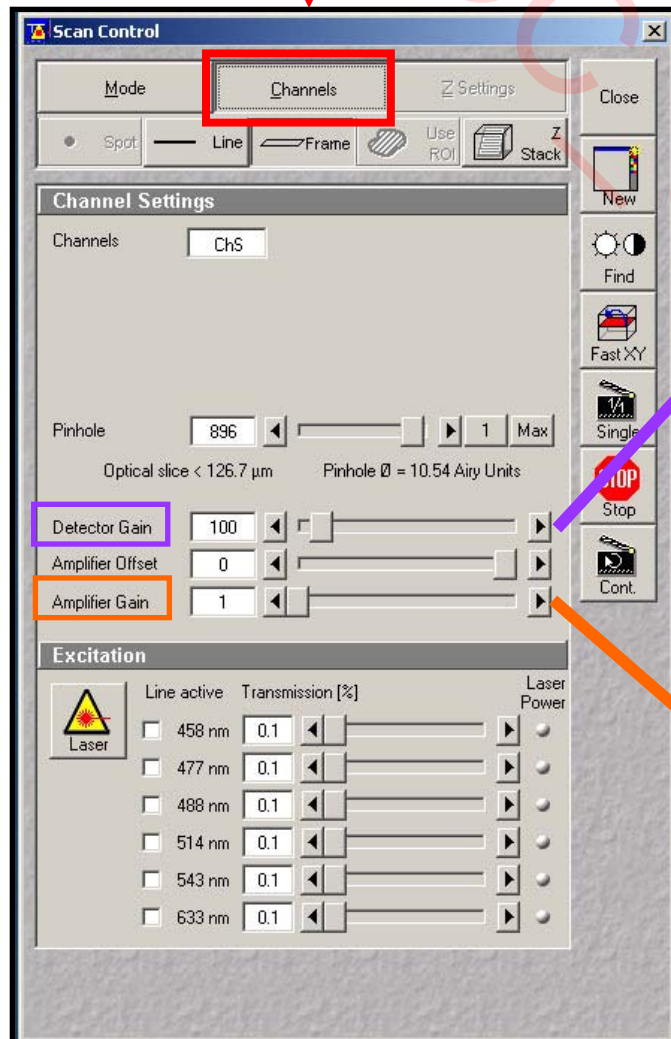
Un solo escaneo en las
condiciones establecidas
en "Mode" (explicado a
continuación)

Detención del escaneo

Escaneo continuo con las
condiciones establecidas en
"Mode" (explicado a
continuación)

Regulación de potencia de los
láseres.

Una potencia muy alta
aumentará el riesgo de que os
quedéis sin fluorescencia,
pero una potencia demasiado
baja os obligará a usar
ganancias muy altas y la
calidad de imagen decaerá.
Tened en cuenta que la línea
488 nm es la más potente de
todas. La 543 nm se suele
usar al 100%.



“Detector Gain”

Regula la sensibilidad del detector.

A mayor ganancia mayor sensibilidad pero también mayor ruido de fondo.

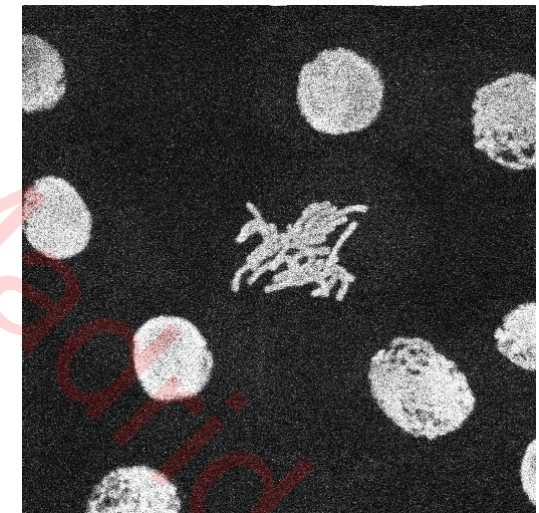
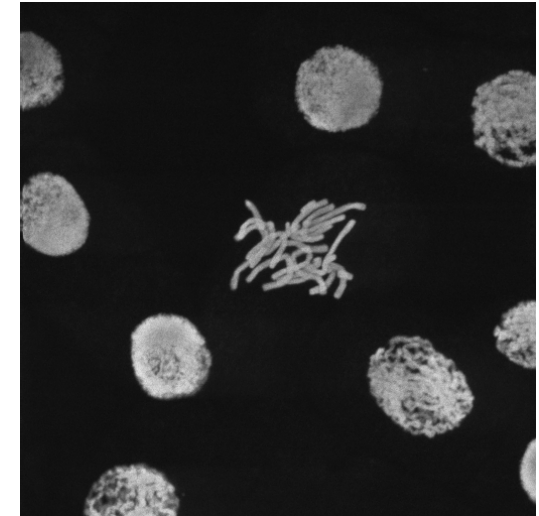
A mayor ganancia menos láser necesitaréis y, por tanto, preservaréis mejor la fluorescencia, pero la calidad de la imagen disminuirá.

“Amplifier Gain”

También regula la sensibilidad del detector. No uséis normalmente esta ganancia a no ser que la anterior esté muy alta. Genera mucho más ruido.

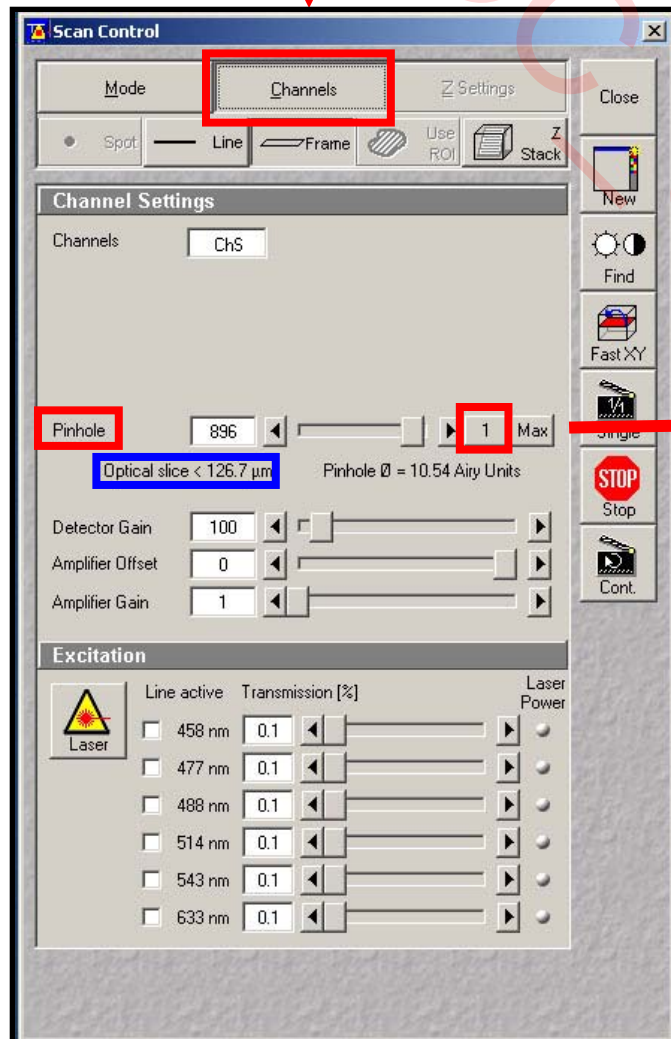
PARÁMETROS DE ESCANEO

GANANCIA





PARÁMETROS DE ESCaneo PINHOLE



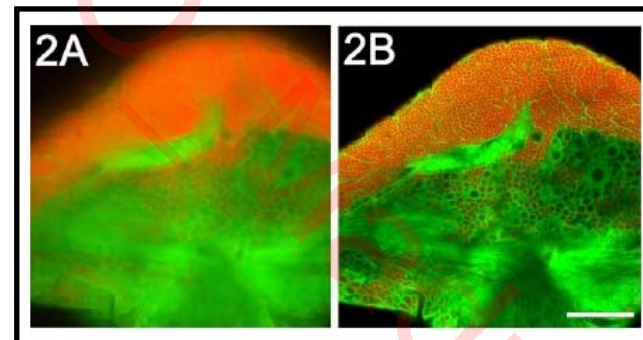
“Pinhole”

Es lo que determina el grosor de sección “**Optical slice**” que estáis recogiendo en todo momento. Cuanto más cerrado menor es el grosor de sección y mayor la resolución óptica pero menos intensidad de fluorescencia llegará al detector.

Os recomendamos que por defecto pongáis **1** (Airy Units) y si no veis nada empezar a abrirlo hasta que consigáis ver señal, siempre teniendo en cuenta que paralelamente estaréis disminuyendo la resolución óptica.

En general no merece la pena bajar de **1 Airy Unit** a no ser que necesitéis la máxima resolución en Z o vayáis a hacer **deconvolución**. En tal caso podéis bajar hasta 0.7 Airy Unit.

Intentar seleccionar un tamaño de **pinhole para cada color** de manera que el grosor de sección que comparéis en cada canal sea similar.

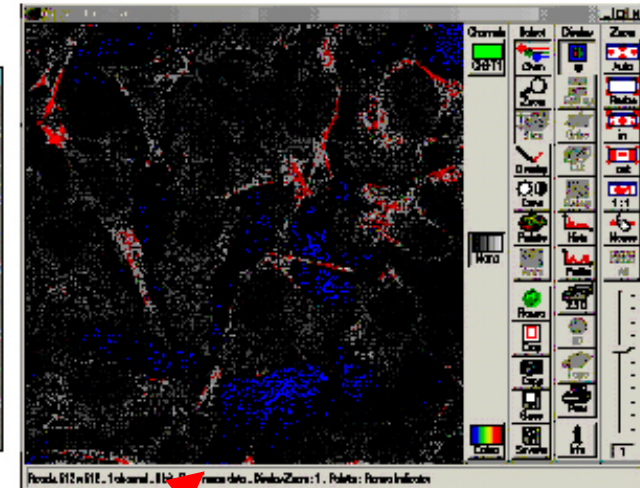
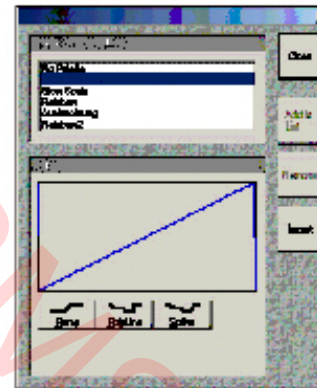
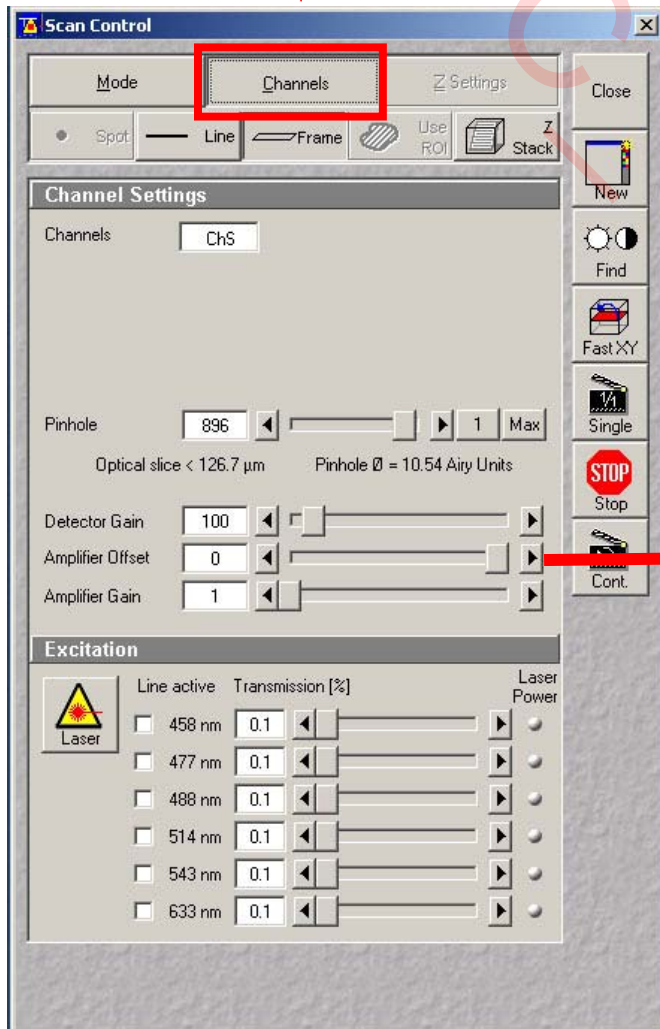


Abierto

Cerrado



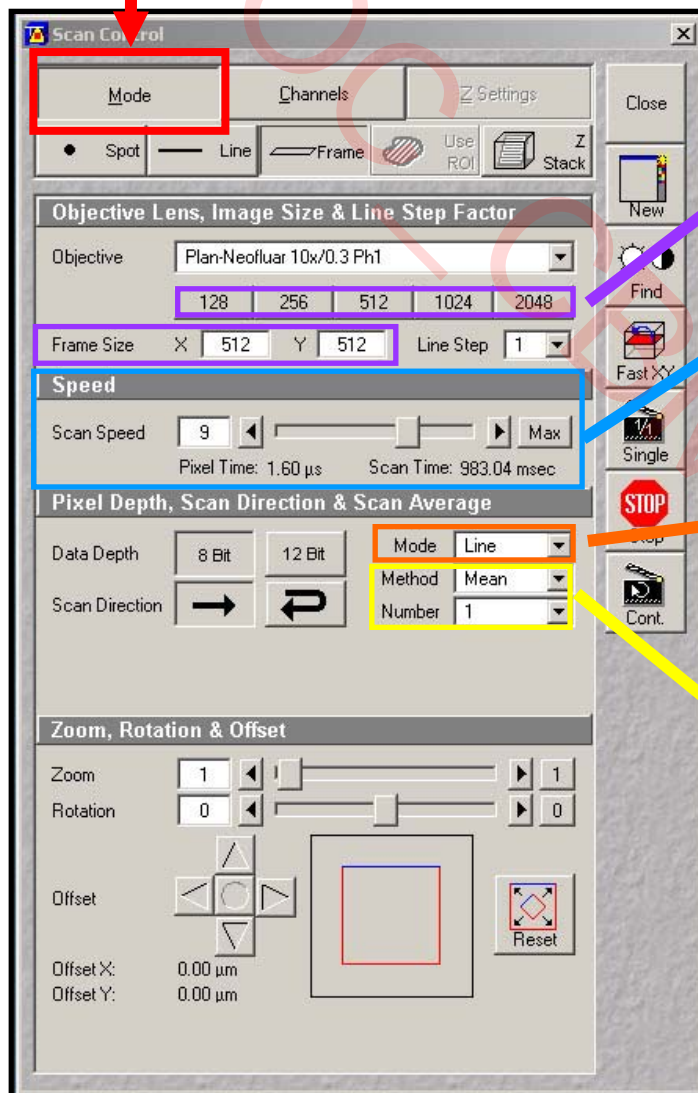
PARÁMETROS DE ESCaneo AMPLIFIER OFFSET



“Amplifier Offset”
Optimiza la escala de grises de las imágenes obtenidas, el valor del fondo. Ir bajando poco a poco hasta que observéis que lo que consideráis fondo se ve azul, tal y como se muestra en la imagen. En general evitar siempre ver saturación de color rojo o azul.



PARÁMETROS DE ADQUISICIÓN (SCAN-MODE)



“Resolución digital”

Selección del número de pixels de la imagen. Normalmente a 512 ó 1024.

“Velocidad escaneo”

Al seleccionar la resolución, y en función de varios parámetros, el sistema ajusta una velocidad óptima. A mayor velocidad mejor preserváis la fluorescencia pero la calidad de imagen será peor.

“Mode”

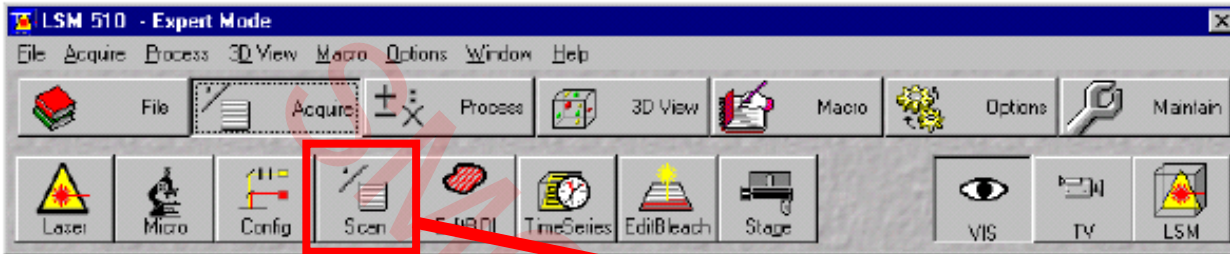
Establece el modo en que realiza el kalman. Normalmente está en “Frame” porque preserva mejor la fluorescencia, aunque en “Line” va algo más rápido y mejora un poco la calidad de la imagen.

“Method” y “Number”

“Mean, Average, Kalman” para mejorar la calidad de imagen haciendo la media del número de escaneos seleccionados en “Number”.

“Sum” se usa cuando hay muy poca fluorescencia. No hace la media de los escaneos sino que los suma. Se acumula la señal pero también el ruido.

Normalmente “Mean” de **2 ó 4** suele ser suficiente. Cuantos más pases deis mejor calidad de imagen pero mayor riesgo de agotar la fluorescencia.



PARÁMETROS DE ADQUISICIÓN (SCAN-MODE)

“Data Depth”

Normalmente usad 8 Bit (0-255 valores de grises) pero cuando necesitéis hacer cuantificaciones o deconvolución es conveniente usar 12 Bit (0-4095 valores de grises), aunque las imágenes os ocuparán bastante más.

“Zoom”

Para dar más aumentos. En general evitad valores por encima de **3** porque no vais a ganar mucha más información y aumentaréis el riesgo de agotar la fluorescencia. Podéis aumentar el campo de observación bajando el zoom hasta **0,7** pero el escaneo será más lento y hay opciones no permitadas.

“Rotation”

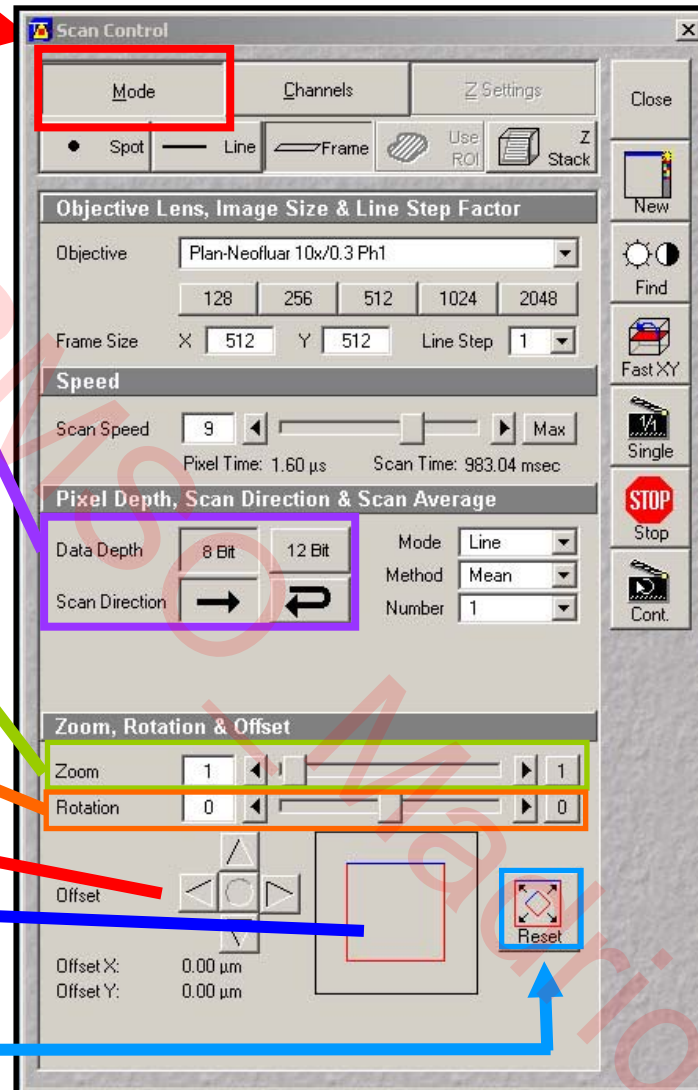
Para girar la imagen

“Offset”

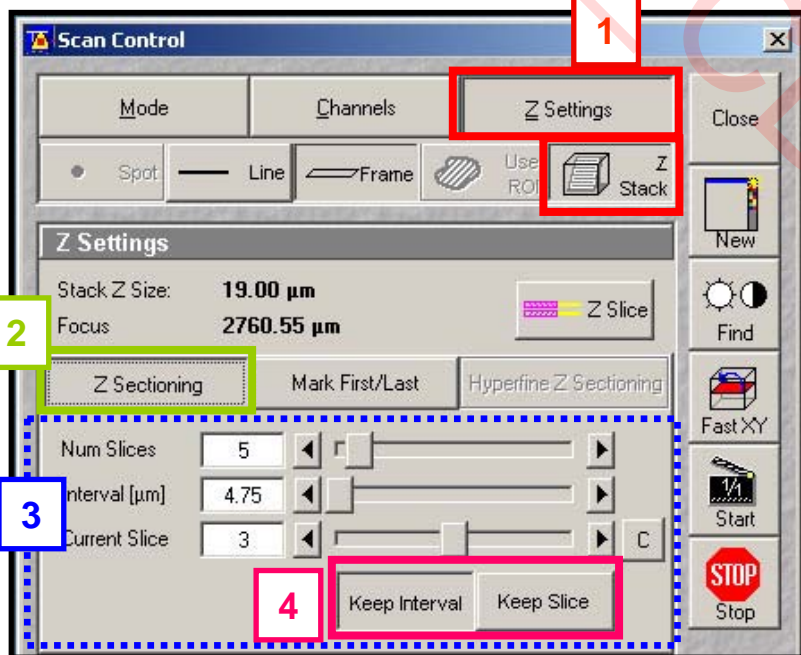
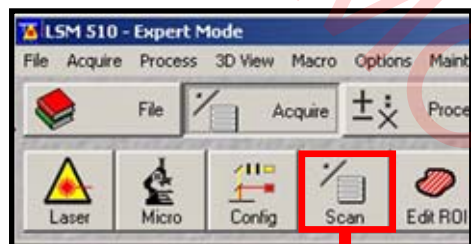
Desplazamiento de la imagen. Lo podéis hacer lentamente con las flechas o seleccionando con el ratón el **cuadro rojo**.

“Reset”

Para quitar el zoom, el giro y el desplazamiento y volver a la posición original.



SECCIONES EN Z (SCAN-Z SETTINGS-Z STACK-Z SECTIONING)



1º) Hacer clic en “Z Settings” y “Z Stack”.

2º) Hacer clic en “Z Sectioning”.

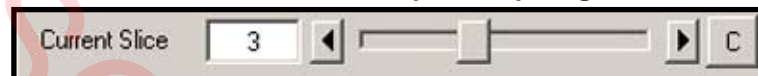
3º) En “Num Slices”, poner el número de planos que se quiere tomar en el eje Z.




En “Interval” definir el intervalo (μm) que va a existir entre cada uno de los planos.



“Current Slice” indica la posición que tendrá el plano que tenemos en foco en ese momento dentro del total de planos que figura en “Num Slices”.



Hacer clic en el icono  si queremos que el plano que tenemos en foco sea el central del stack. En este caso se cogerán planos por arriba y por debajo del mismo.

4º) Hacer clic en “Keep Interval” para mantener el valor del intervalo al variar el número de planos, o “Keep Slice” para mantener el número de planos.

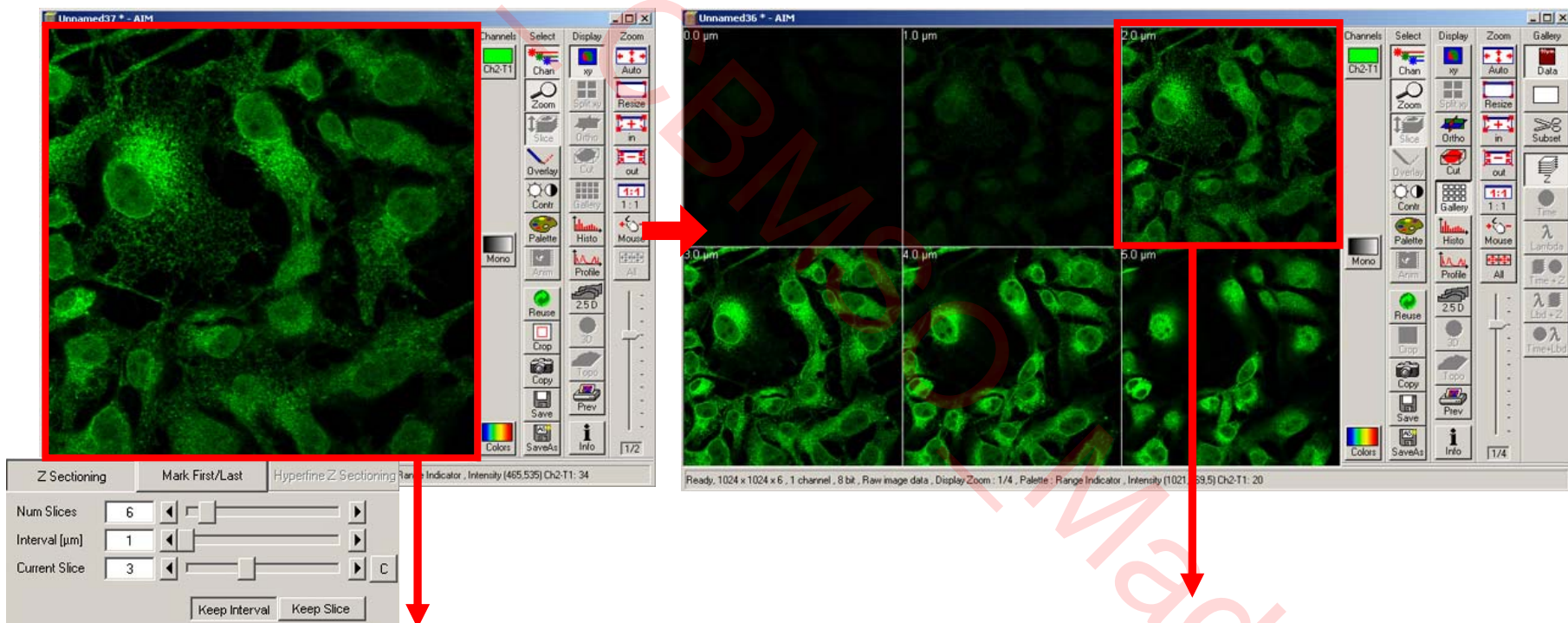


5º) Seleccionar “Start” para comenzar a hacer los cortes.

ATENCIÓN:

- Comprobar la posición del plano en foco antes de tomar el stack. Si por alguna razón se cambia el plano de origen sin darnos cuenta se modificará todo lo demás.

EJEMPLO



Plano en foco

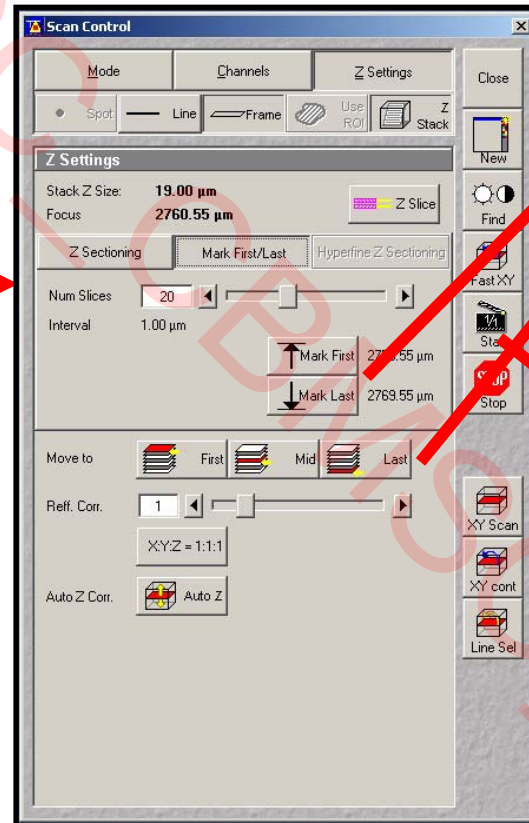
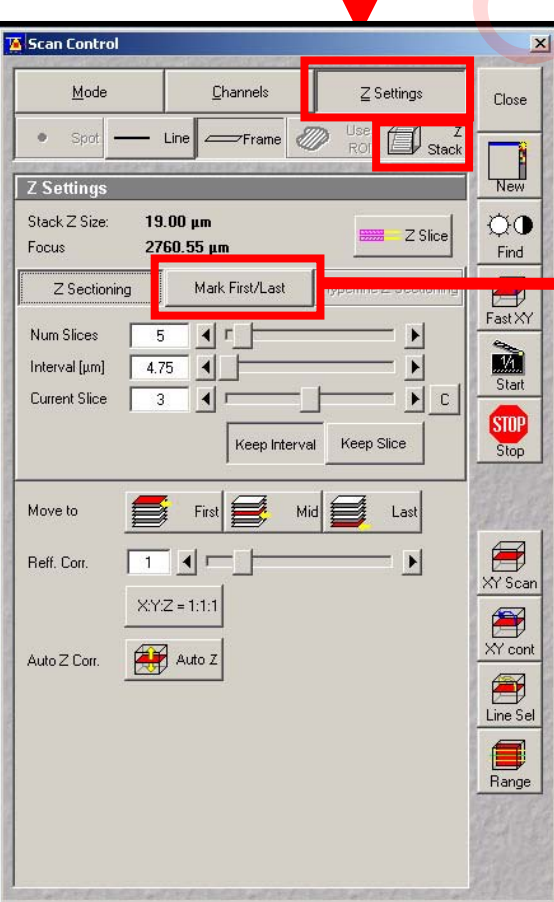
Stack

(Queremos que el plano que tenemos en foco sea el plano número 3 de un stack de 6 planos. Escribimos 3 en “Current Slice”)

(El plano en foco es el número 3 del stack)



SECCIONES EN Z (SCAN-Z SETTINGS-Z STACK-MARK FIRST/LAST)



1º) Mover el enfoque hasta los límites entre los que queréis hacer las secciones. El límite superior grabarlo en **"Mark First"** y el inferior en **"Mark Last"**

2º) Con estos botones podréis desplazaros a las posiciones **"First"**, **"Mid"** y **"Last"** entre los límites seleccionados, comprobando que son correctos.

3º) Seleccionar el número de cortes que queréis hacer (Ver siguiente diapositiva)

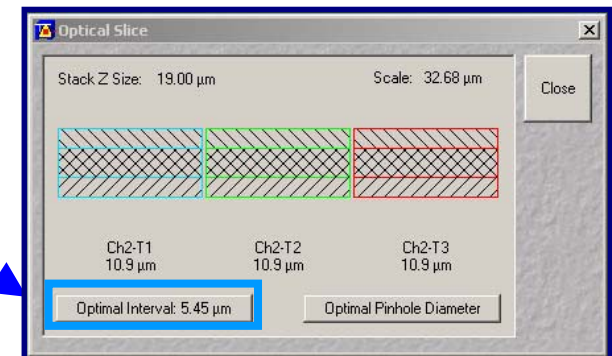
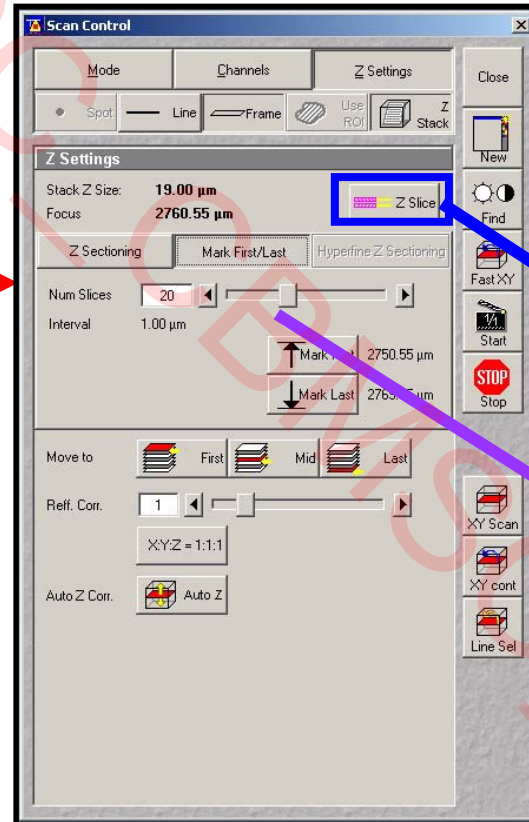
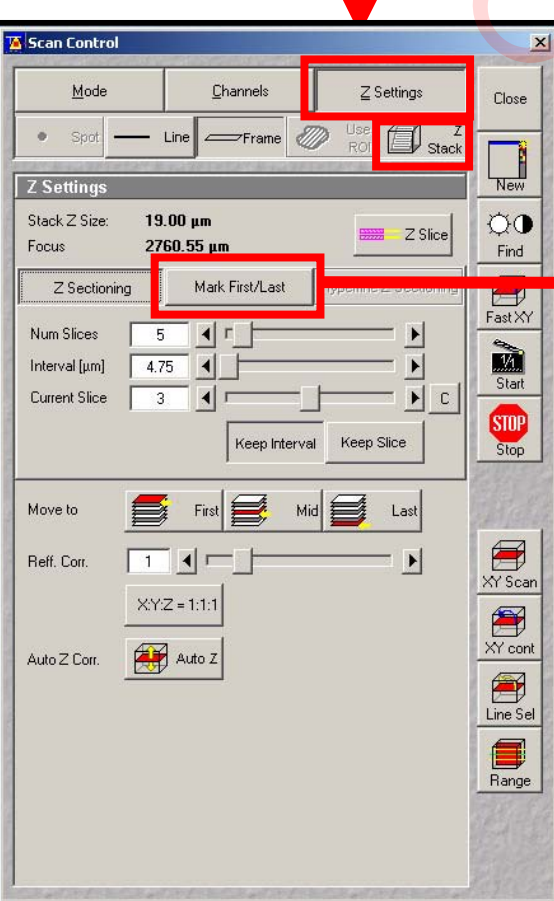
4º) Seleccionar **"Start"** para comenzar a hacer los cortes.

"XY Scan" para escanera un solo plano en la posición actual con las condiciones seleccionadas en **"Mode"**.

"XY cont" para un escaneo continuo de un solo plano en la posición actual con las condiciones seleccionadas en **"Mode"**.



SECCIONES EN Z Nº DE CORTES E INTERVALO

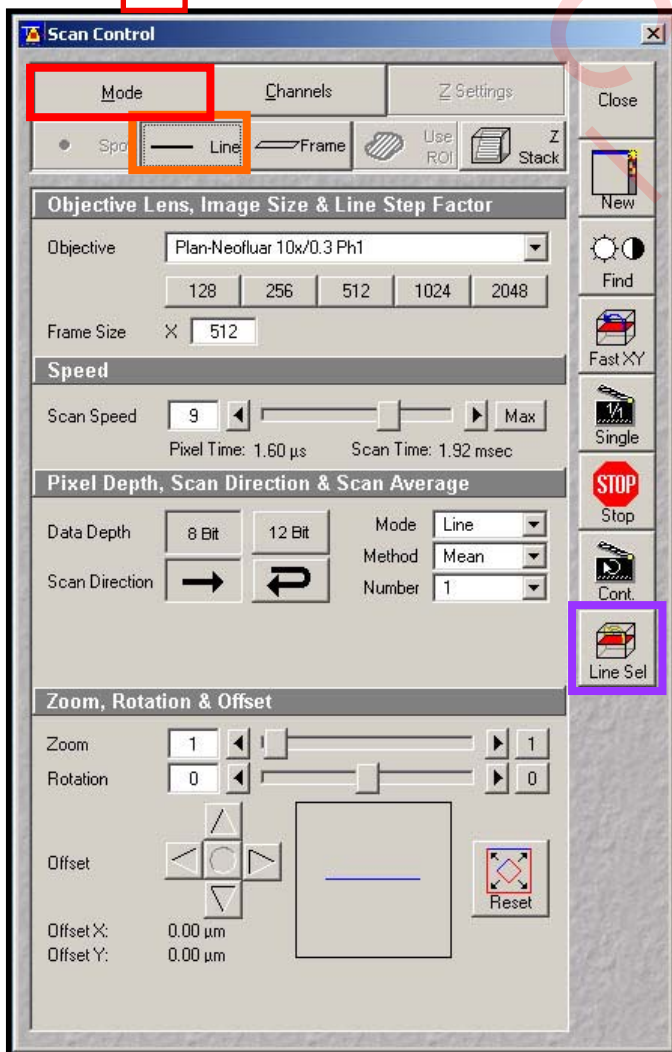


3º) Seleccionar el número de cortes que queréis hacer (**Num. Silces**) o el intervalo entre los cortes (**Interval**). El programa ajustará automáticamente el parámetro correspondiente en función de los límites seleccionados.

Si queréis saber el número de cortes recomendado para esas condiciones seleccionar "**Z Slice**" y a continuación "**Optimal Interval**". Automáticamente insertará ese valor en el cuadro "**Interval**".

SECCIONES EN Z CORTE TRANSVERSAL EN Z (SCAN-MODE-LINE)

1



1) Si lo que queremos es hacer un solo corte en Z deberemos seleccionar “Line” en el panel “Mode”. Aparece una sola línea en vez de un cuadro en la sección “Zoom, Rotation & Offset”,

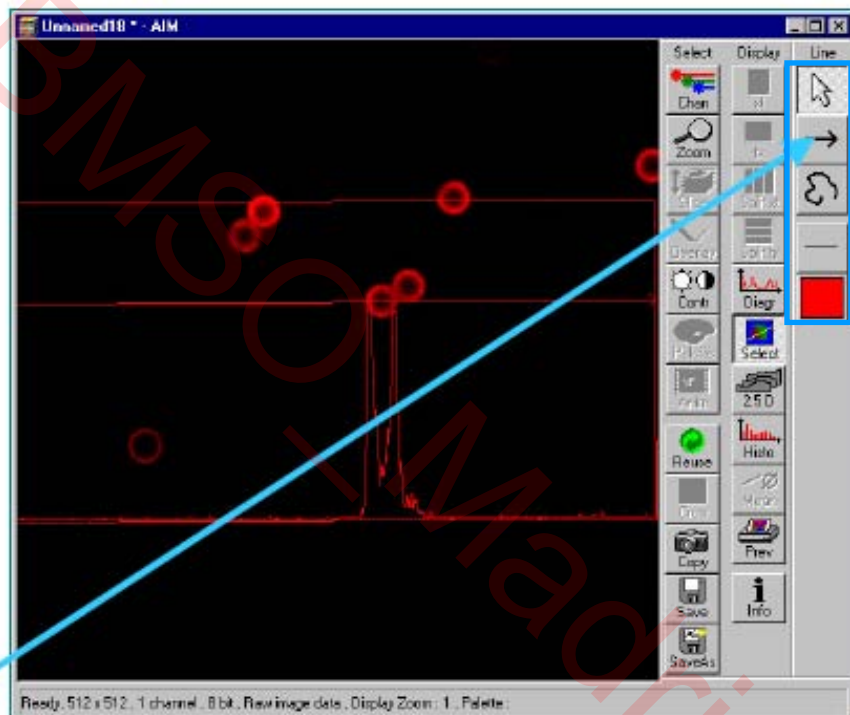
2) Seleccionar “Line Sel”,

3) Con las herramientas de dibujar trazar la figura que queremos hacer,

4) Presionar “Start” y obtendremos un corte ortogonal único.

Recomendaciones:

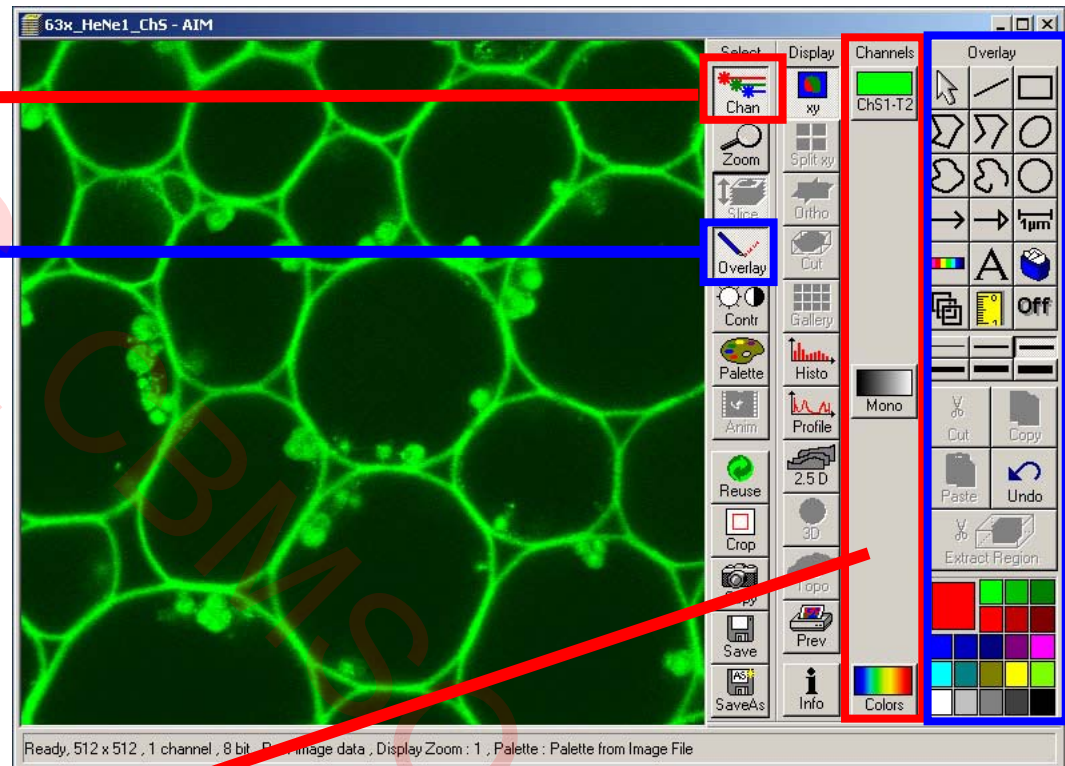
- Usar un Zoom mínimo de 1
- Seleccionar en el panel “Z Stack” un mínimo de 40-50 secciones (Num Slices). A veces es bueno disminuir un poco más el intervalo recomendado en “Z Slice” (diapositiva anterior).



PANEL DE IMAGEN

Abre el panel de los canales

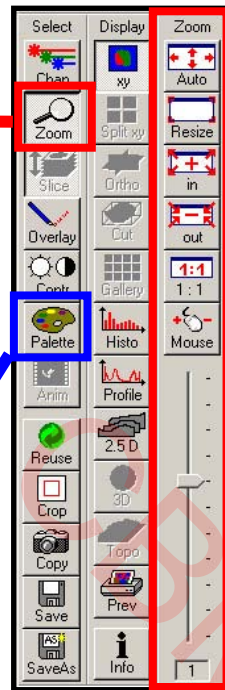
Abre el panel de las herramientas de dibujo



Panel de Canales
Se muestran los diferentes canales.
Se puede cambiar su color
seleccionando en su icono.
Seleccionando el icono "Mono" se
verán las imágenes en blanco y
negro.

Herramientas de dibujo
Se pueden añadir regiones, flechas,
barras de calibración, etc.

Abre el panel de Zoom



Panel de Zoom

“Auto”- arrastrando las esquinas de la imagen se autoajusta el tamaño.

“Resize”- se vuelve al tamaño original

“in”- aumenta el tamaño de la ventana

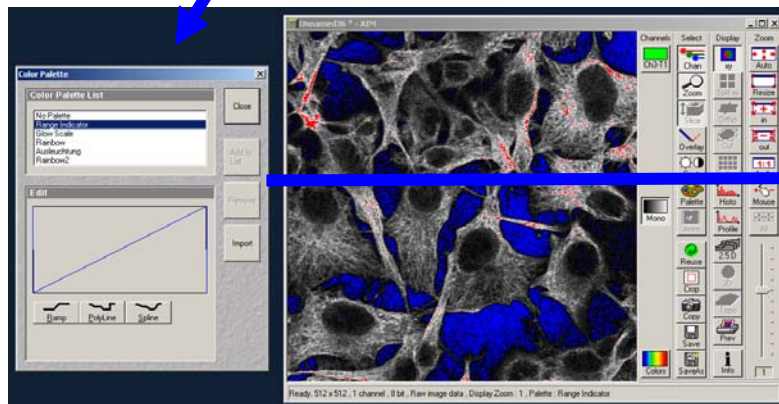
“out”- disminuye el tamaño de la ventana

“1:1”- muestra la imagen a tamaño real

“Mouse”- con el botón izquierdo del ratón aumentamos el zoom y con el derecho lo reducimos

“Barra”- desplazando la punta de flecha aumentamos o reducimos el zoom.

Abre el panel de Paletas de colores



Panel de Paletas de colores

Se selecciona la paleta de colores que se quiere utilizar.

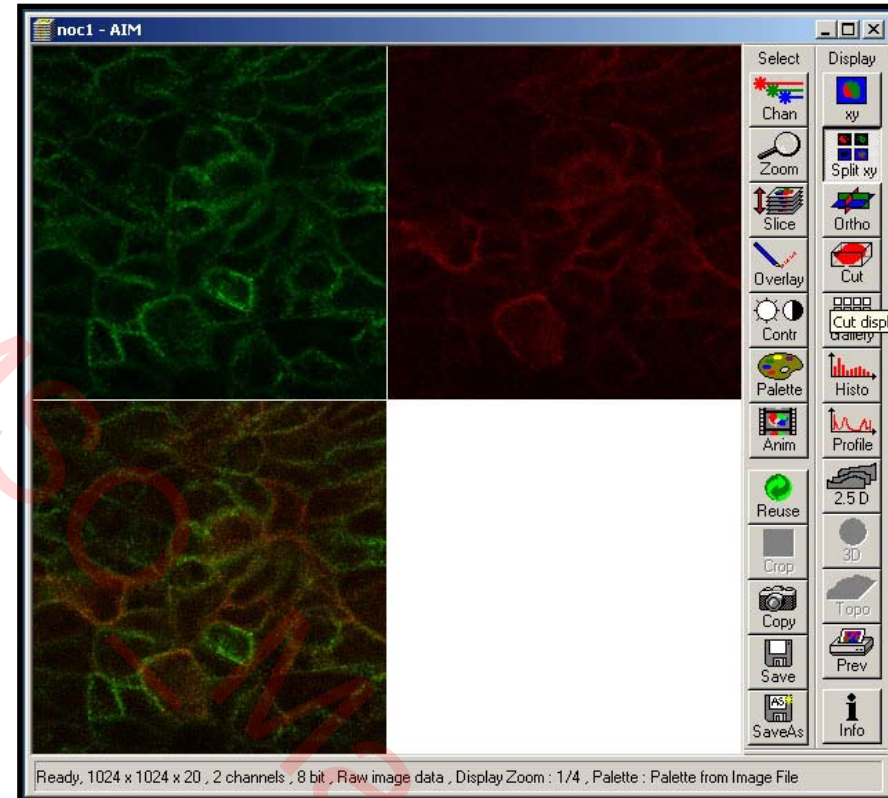
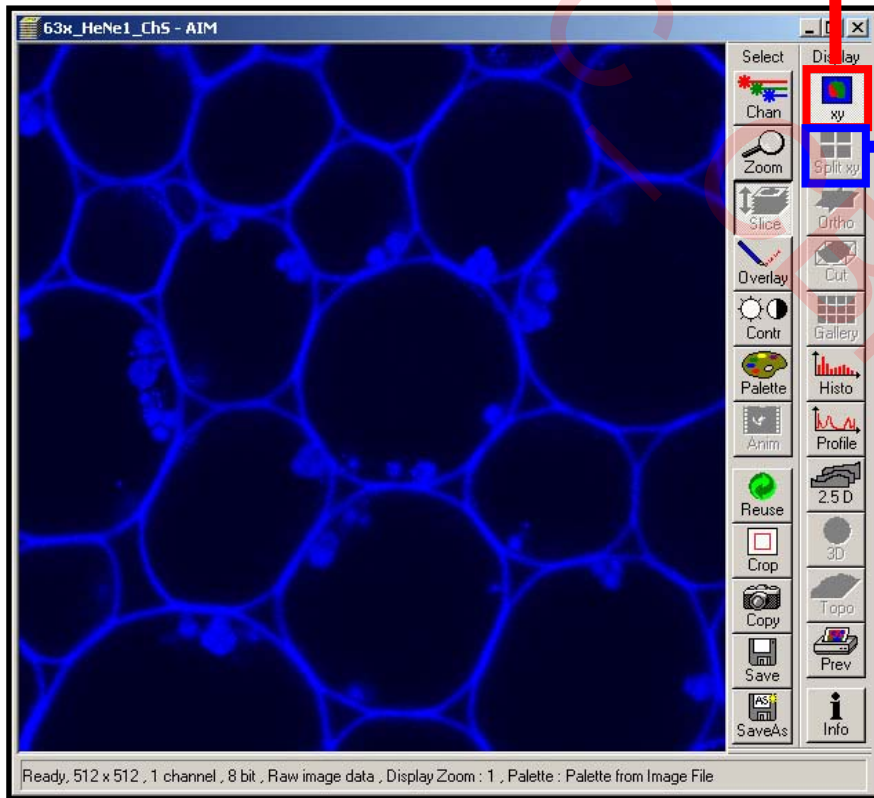
La más recomendada para optimizar la adquisición de imágenes es la “Range indicator”.

Para medir cambios de intensidad la “Rainbow” puede ser muy útil.

Visualización de los canales

“**xy**”- os mostrará la mezcla de los canales (merge)

“**Split xy**”- os mostrará cada uno de los canales por separado y su mezcla



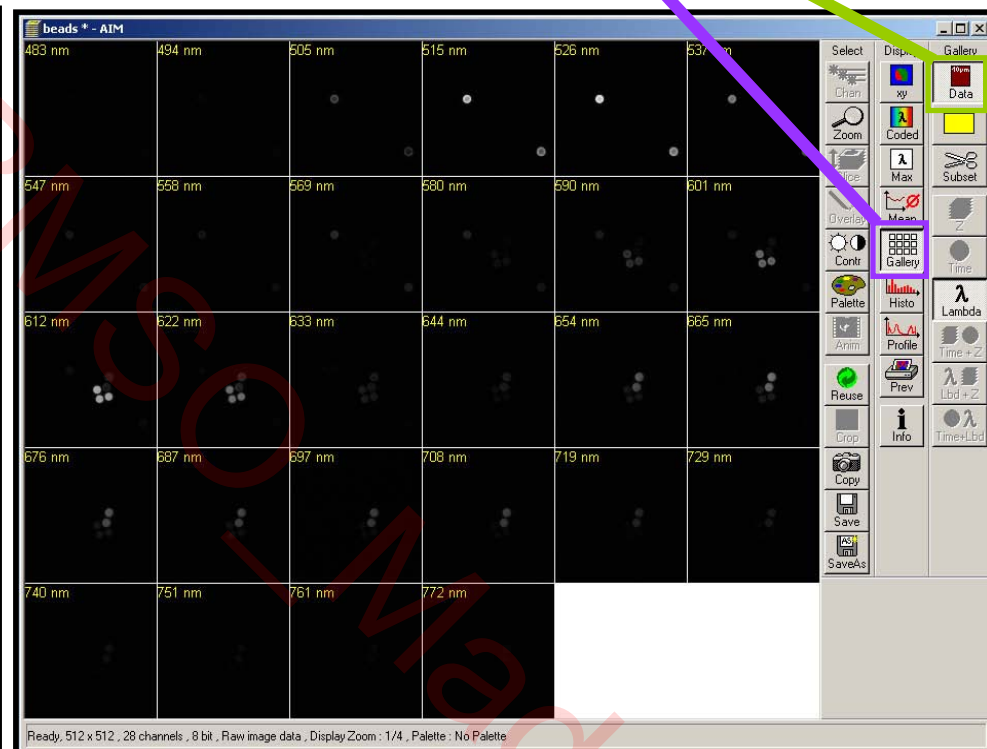
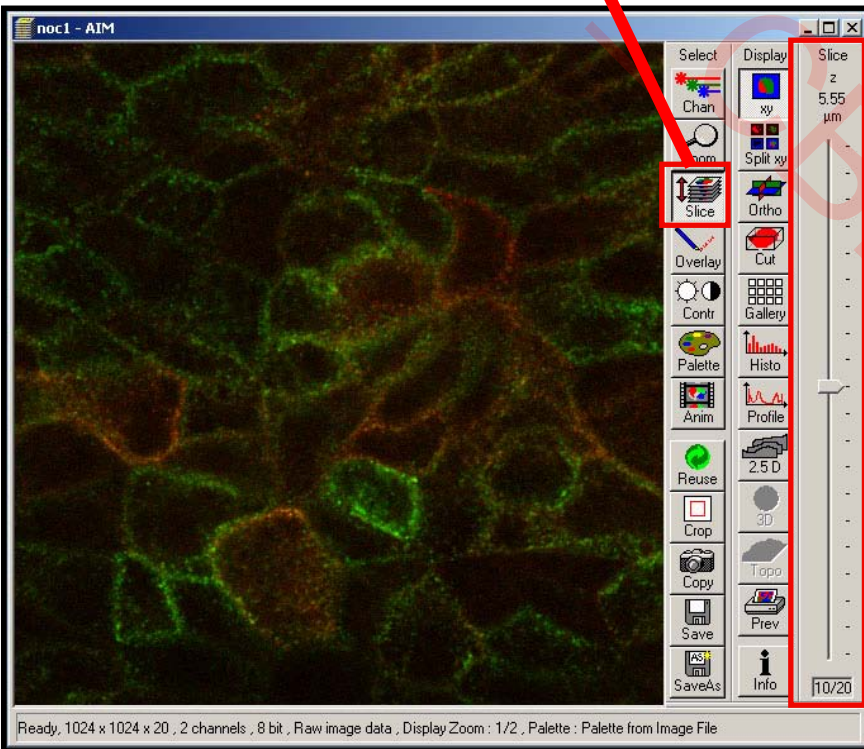
“Slice”

Al seleccionar este icono aparece la barra de desplazamiento por las diferentes secciones obtenidas.

“Gallery”

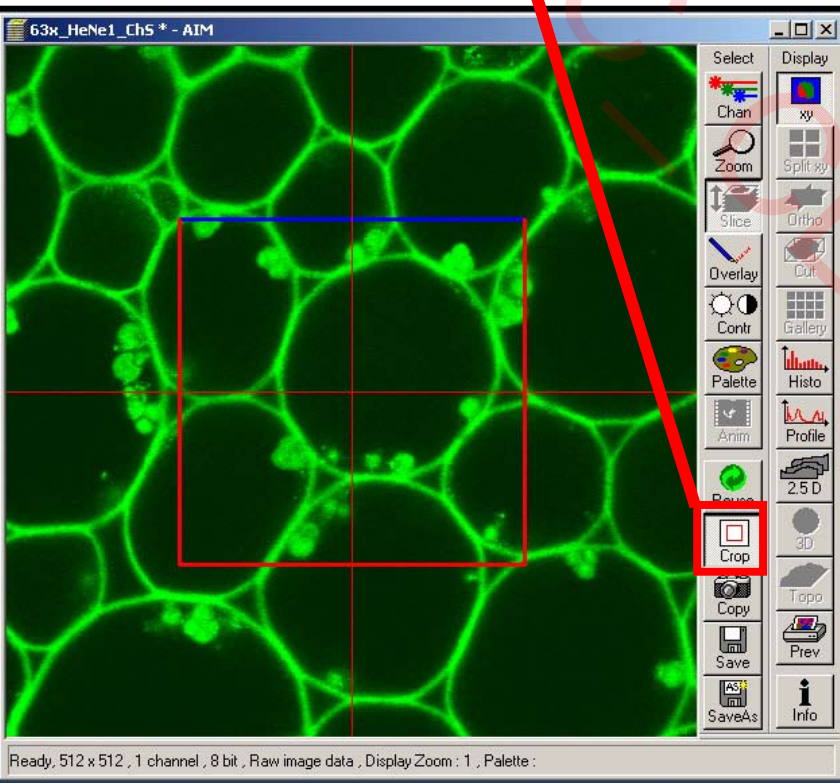
Cuando tengáis planos (Z) o diferentes tiempos (T) os aparecerá este icono. Os permite ver todas las imágenes en miniatura.

Si seleccionáis “Data” os mostrará la información en Z o T.



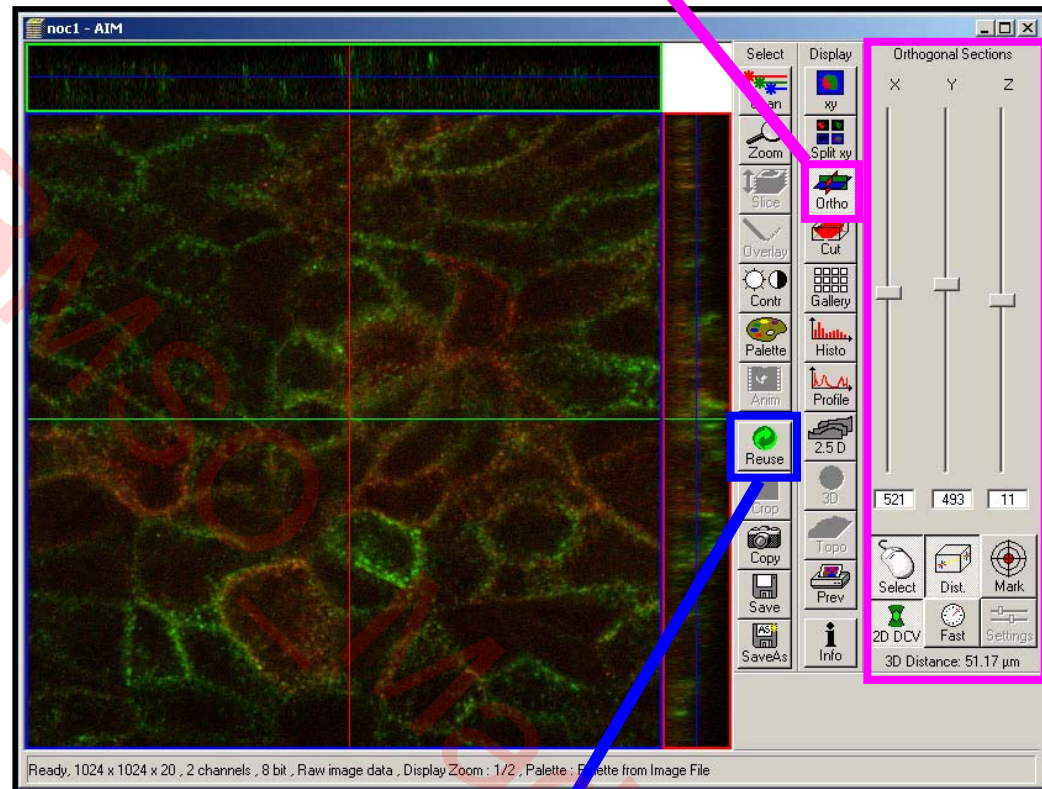
“Crop” o zoom interactivo

Esta herramienta permite seleccionar un zoom y girar la imagen de manera interactiva ayudándose con el ratón. Cuando la uséis os cambiarán las condiciones de adquisición del panel “Mode” que tuviérais.



“Ortho”

Os muestra la barra de herramientas para visualizar los cortes ortogonales para una serie en Z.



“Reuse”

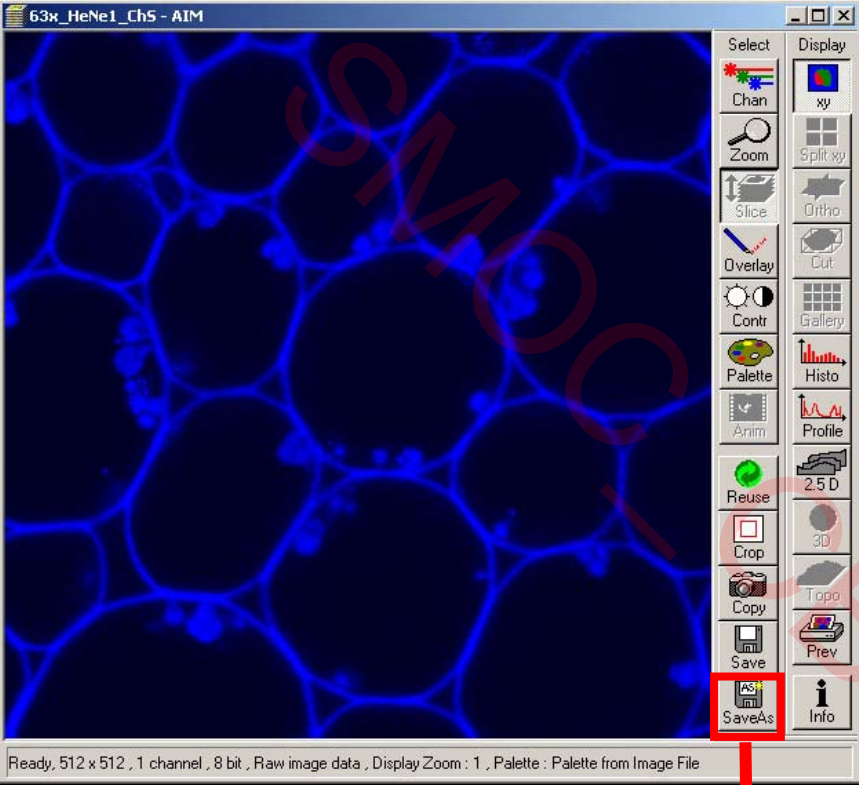
Con esta función el sistema captura todas las condiciones de adquisición de esa imagen para ser utilizadas a continuación.

MANEJO DE LAS IMÁGENES

NOTA IMPORTANTE:

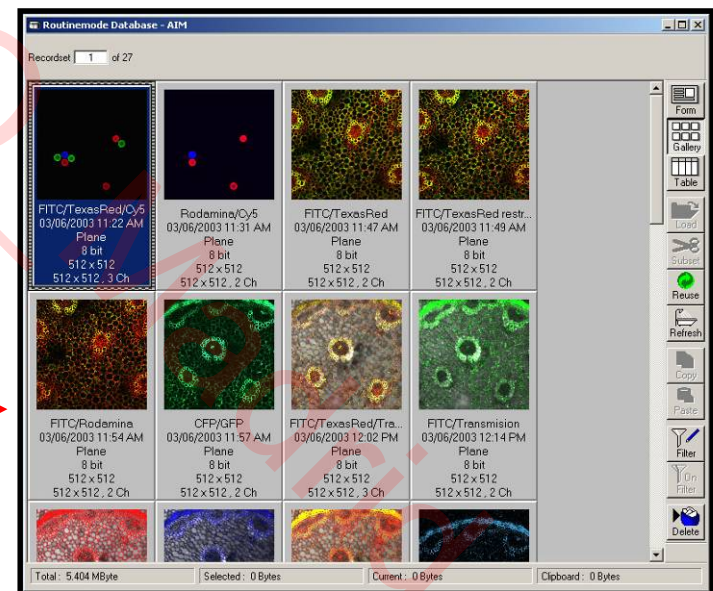
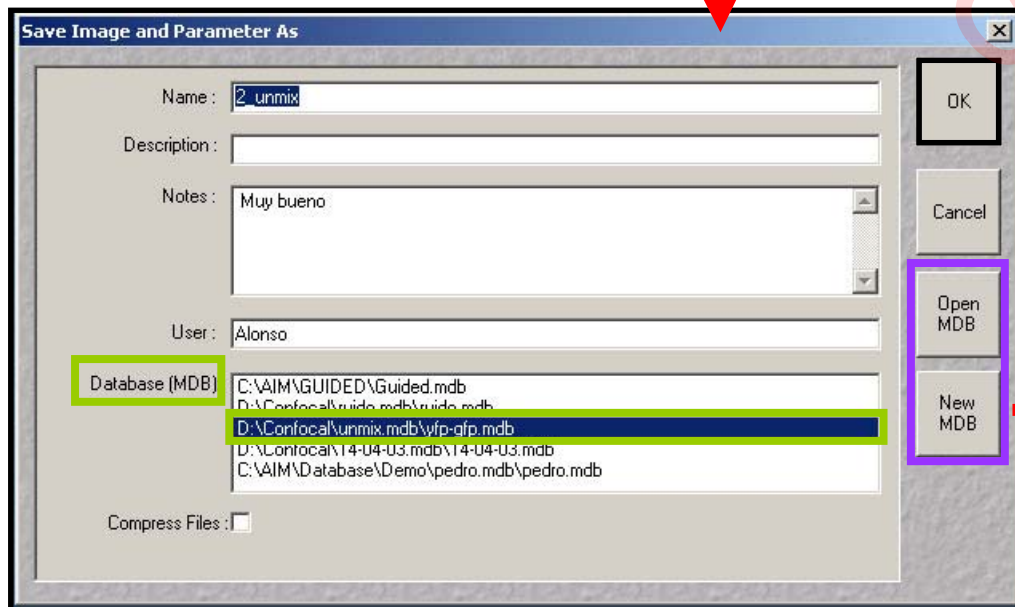
No guardar nunca archivos en el escritorio. Salvar las imágenes siempre en vuestra carpeta correspondiente en el Disco “Imágenes o Experiments”.

Borrarlas del ordenador cuanto antes. En caso de necesidad borraremos las imágenes con más de dos meses de antigüedad, sin previo aviso.



Guardar imágenes

- 1) Seleccionar **“Save as”** en el panel de la imagen.
- 2) Seleccionar **“New MDB”** para crear una nueva base de datos u **“Open MDB”** si queréis guardar las imágenes en una base de datos ya creada. Una vez introducidos los datos se abrirá un panel similar al mostrado. Guardar siempre las **imágenes en vuestra carpeta en el disco “Imágenes”**, nunca las guardéis en el escritorio.
- 3) Comprobar que en **“Database (MDB)”** aparece destacada la base de datos que acabáis de crear o seleccionar. Es donde se guardarán las imágenes a partir de ese momento.
- 4) Poner toda la información que querías en los apartados disponibles.
- 5) OK



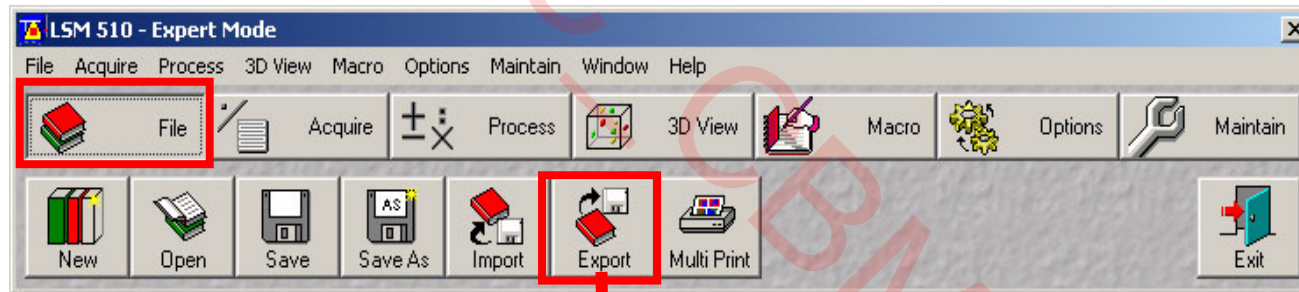
Exportar imágenes

1) Seleccionar el menú “**File**” y posteriormente “**Export**”.

2) **Channels**: si seleccionáis “**Monochrome**” podréis salvar cada canal por separado, si no salvaréis una imagen con la mezcla de todos ellos.

3) **Image Type**: “**Raw data single**” (salva el plano de la imagen que estáis viendo), “**Contents of image window single**” (salva la imagen que estáis viendo a la resolución de visualización en la pantalla y con todos los dibujos o modificaciones que hayáis realizado), “**Contents of image window series**” (lo mismo de antes pero os guardará todas las secciones), “**Full resolution image window single**” (salva la imagen que estáis viendo a la resolución original), “**Full resolution image window series**” (lo mismo de antes pero os guardará todas las secciones). **Para acceder a todas estas opciones es necesario que la imagen se esté visualizando como “xy” y no como “Split xy” (Pag.51).**

4) **Save as type**: os recomendamos que uséis siempre el formato “**TIF- Tagged Image File (*.tif)**”



Visualizar las imágenes

- Para ver las imágenes exportadas como “*.tif” casi cualquier programa os sirve.

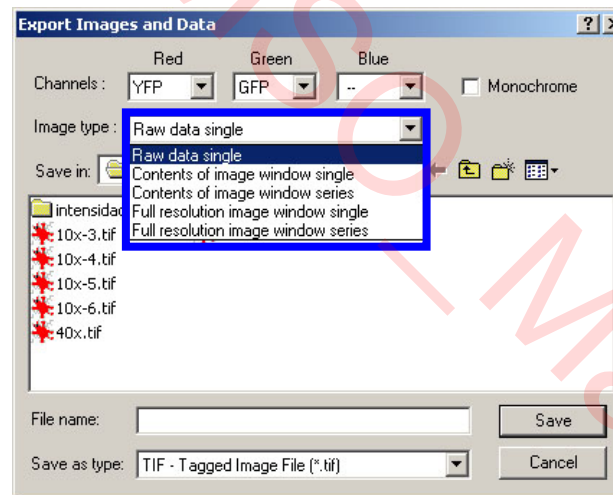
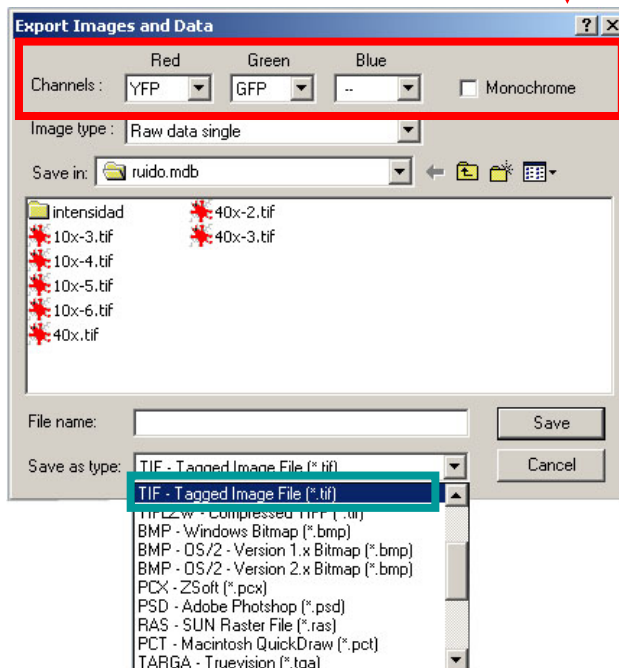
- Para ver las imágenes en formato zeiss “*.ism” tenéis las siguientes opciones:

1) **Metamorph**, instalado en las estaciones de trabajo,

2) **Image J** (Para Mac y PC). Tenéis información en nuestra página Web (Software),

3) **Confocal Zeiss Image Browser** (sólo PC).

Podéis bajaros el programa en nuestra página Web (Software/Programas).



PROBLEMAS FRECUENTES

Problema:

He apagado el microscopio mientras estaba dentro del programa LSM510 o durante el inicio del sistema me aparece un panel de errores similar a éste.

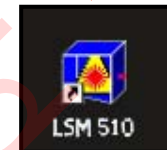
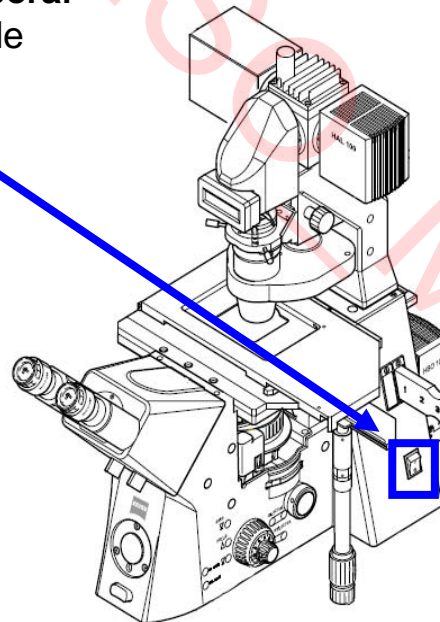
Solución:

1º Cerrar el programa del LSM.

2º Comprobar que está encendido el botón de **Components** . Si no está encendido pulsarle a posición **On** y abrir de nuevo el programa LSM.

Si el botón de **Components** está en posición On:

3º Apagar el microscopio en el **interruptor**. Esperar unos segundos, volver a encenderlo y abrir de nuevo el programa **LSM510** del confocal.

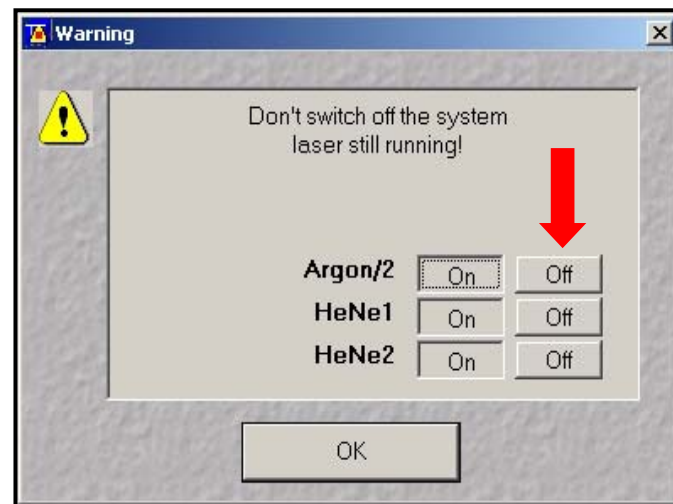


Problema:

He apagado los láseres por error.

Solución:

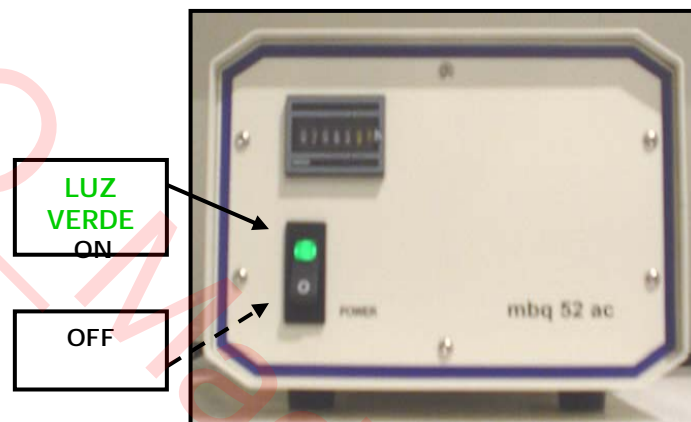
Esperar al menos 30 minutos antes de volverlos a encender.

**Problema:**

He apagado la lámpara de fluorescencia por error.

Solución:

Esperar al menos 1 hora antes de volver a encenderla.



Problema:

No estoy seguro de la hora a la que han apagado la lámpara de fluorescencia.

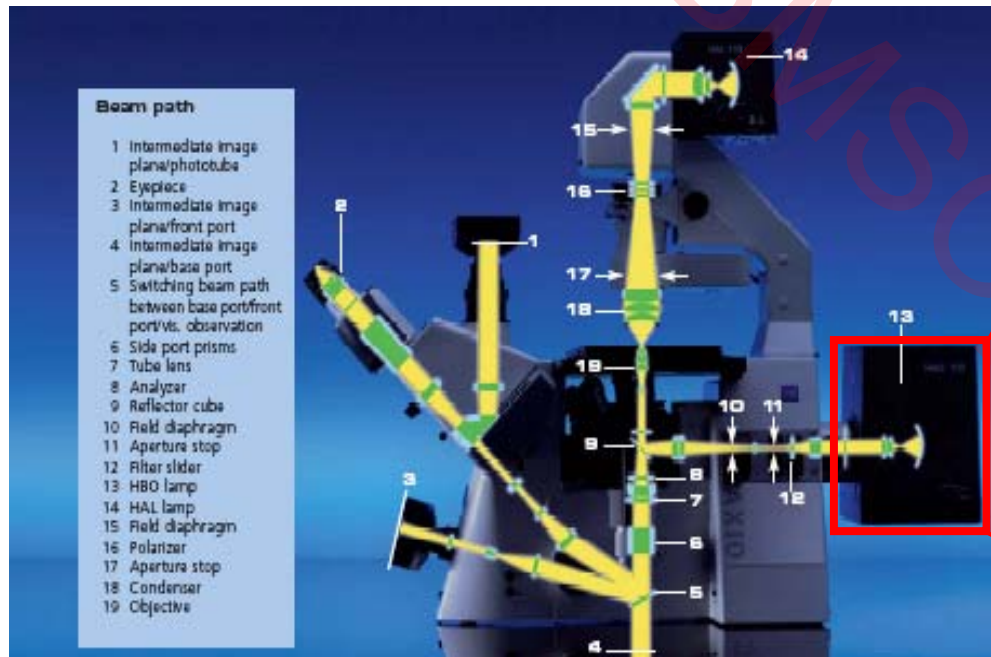
Solución:

Tocar la caja de la lámpara de fluorescencia HBO (13).

Si está caliente no encenderla hasta que se haya enfriado.

Si está fría puede encenderse la lámpara con normalidad.

**Encenderla antes de que se enfríe es muy peligroso.
Os recordamos que son lámparas de mercurio, que es muy tóxico.**



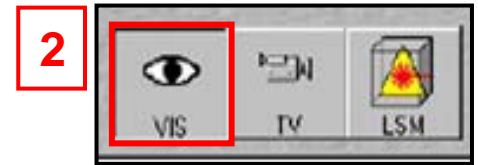
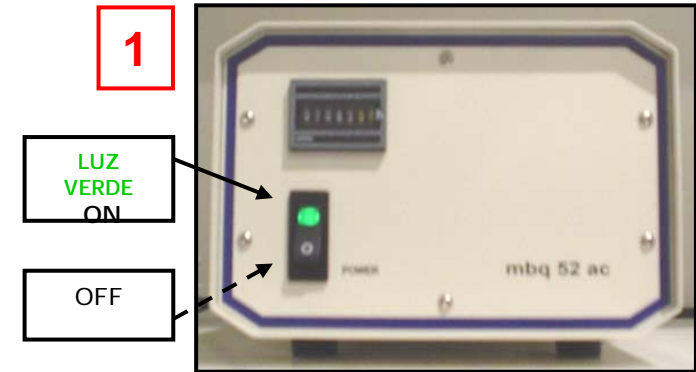
Problema:

No veo **fluorescencia** a través del microscopio.

¿Sale luz del objetivo? **NO**

Solución:

- Comprobar que la lámpara de fluorescencia está encendida (1).
- Comprobar si está activado el modo “VIS” en el programa LSM510 (2).
- Comprobar si está seleccionada la combinación de filtros correcta (3).
- Si aún así no sale luz por el objetivo avisad al personal del SMOC.



Problema:

No veo **fluorescencia** a través del microscopio.

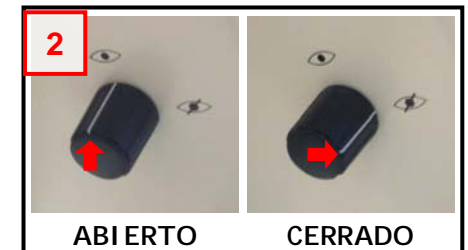
¿Sale luz del objetivo? **SÍ**

Solución:

- Comprobar que se está utilizando el filtro de fluorescencia adecuado (1).



- Comprobar el paso de luz a los oculares ubicado justo debajo de ellos (2).



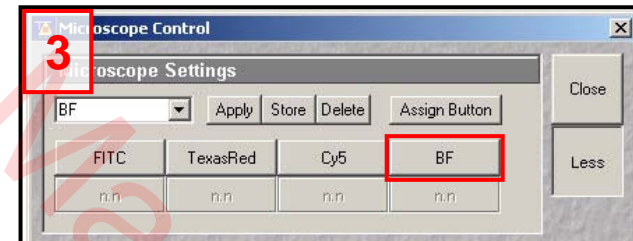
Problema:

No veo **luz transmitida** a través del microscopio.

¿Sale luz del objetivo? **NO**

Solución:

- Subir la intensidad de luz con el regulador de potencia de luz transmitida(1).
- Comprobar si está activado el modo “VIS” en el programa LSM510 (2).
- Comprobar si está seleccionada la combinación de filtros correcta (3).
- Si aún así no sale luz por el objetivo avisad al personal del SMOC.



Problema:

No veo **luz transmitida** a través del microscopio.

¿Sale luz del objetivo? **SÍ**

Solución:

- 1) ¿Se ha realizado el ajuste de Köhler?
- 2) Seguid las instrucciones para ver Nomarski o campo claro.

- 3) Comprobar el paso de luz a los oculares (3)



Problema:

Al escanear no se observa ninguna imagen o es muy débil.

Solución:

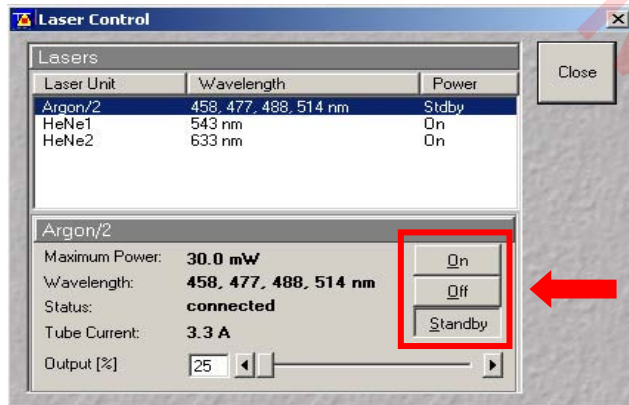
Comprobar que la **línea de láser** está activada (1).

Revisar que el **láser esté encendido**, en posición On (2).

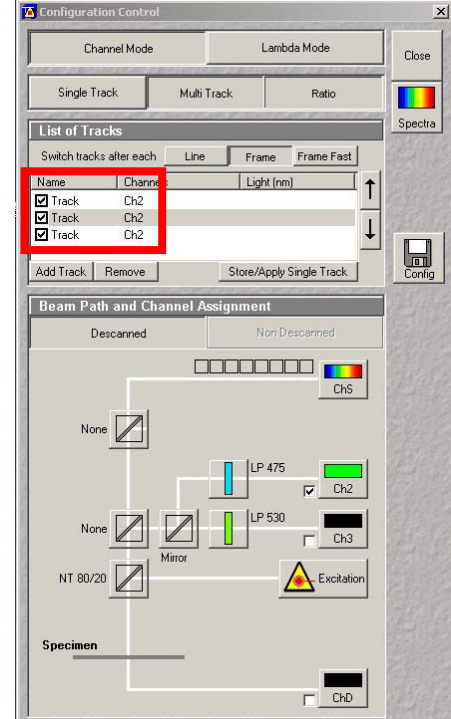
Subir la potencia del **láser** y la **ganancia** (3).

Abrir el **pinhole** (4).

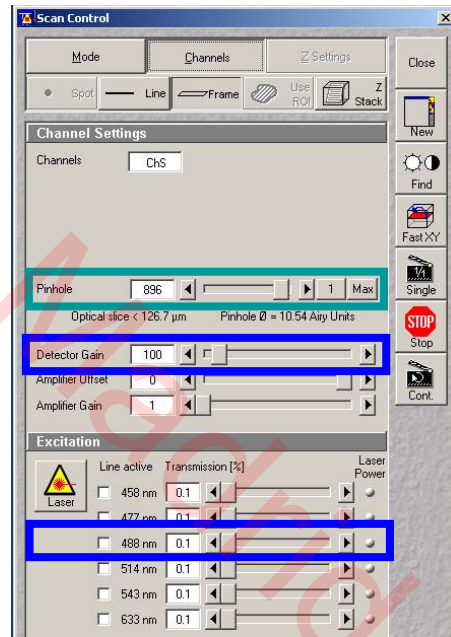
2



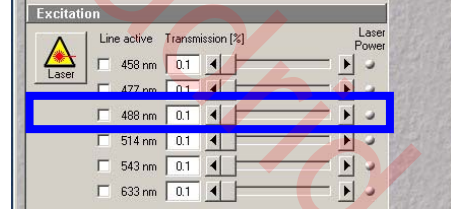
1



4



3



Problema:

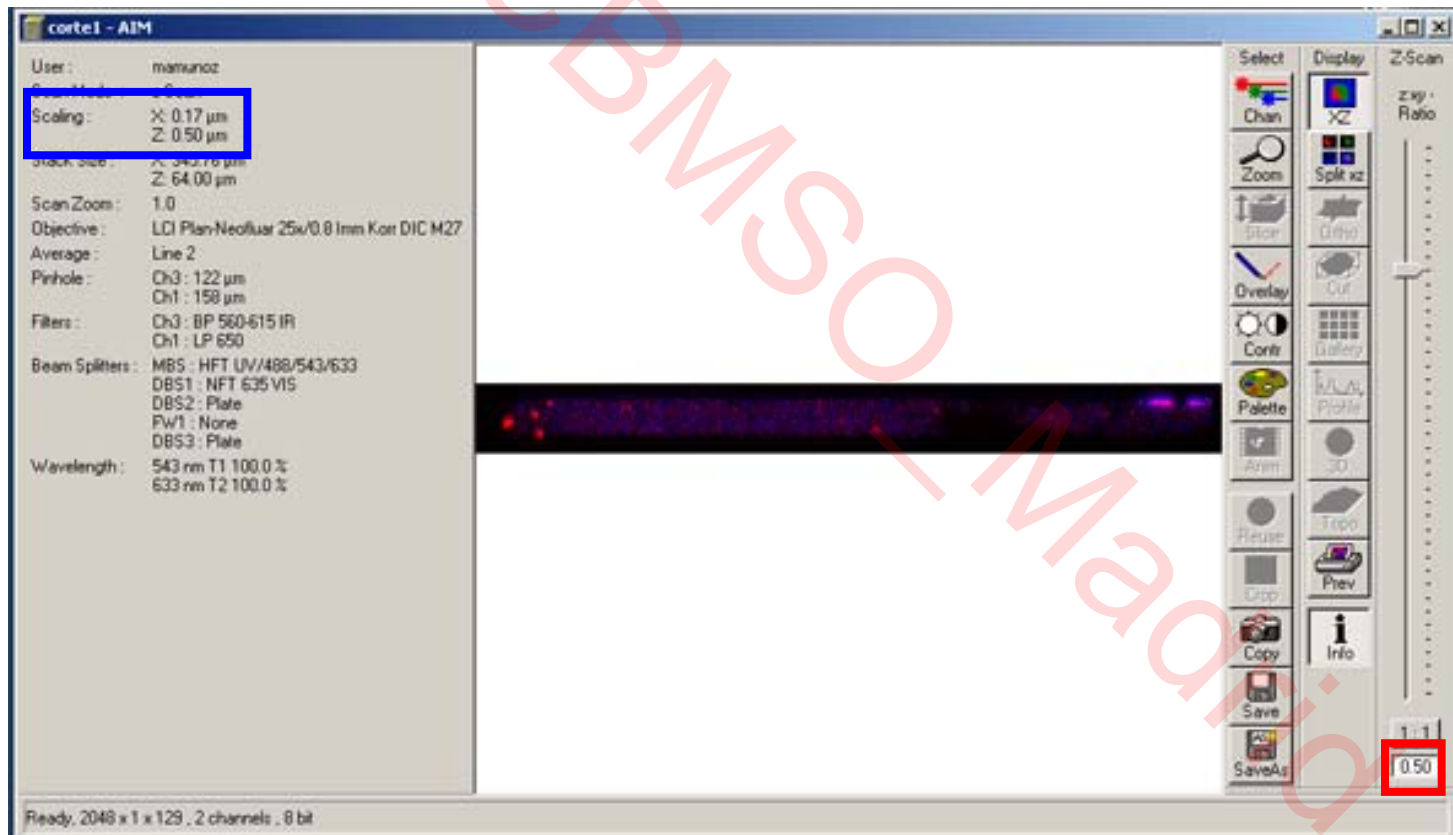
Al salvar un corte ortogonal como "*.tif" me queda demasiado estrecho.

Solución:

Lo mejor es guardar el archivo en formato "*.ism" de Zeiss, pero si se tiene que exportar como "*.tif":

- 1) Aumentar el número de secciones. El salto máximo que debemos poner entre secciones es el grosor de la sección que estamos recogiendo (Pag.39) dividido por 4 ó 5.
- 2) Exportar el corte como "Full resolution image window single" (Pag.57) asegurándonos de que en el **panel 1** está puesto el salto que nos interesa. Como mínimo el valor original que hemos usado para obtener el corte (**Panel 2**). Si queremos que se vea más grueso aumentaremos ese valor.

2



1